

UNIVERSITÉ DE LYON
FACULTÉ MIXTE DE MÉDECINE ET DE PHARMACIE

Année 1963 - N° 501

INFLUENCE DE L'EXTRAIT DE TRYPANOSOMA CRUZI SUR DIVERS ASPECTS METABOLIQUES DE LA CELLULE SARCOMATEUSE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

*présentée et soutenue publiquement
devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
le 27 juin 1963*

PAR

Jacqueline MICHEL-BRUN

*Pharmacien de la Faculté de Paris
Assistante à la Chaire de Parasitologie et Pathologie Exotique
Diplômée d'Etudes Spéciales de Parasitologie,
d'Hématologie, de Bactériologie, de Sérologie.*

Née le 20 janvier 1922 à Montjay (Hautes-Alpes)



LYON
Imprimerie Sallaz
16, RUE BARODET

1963

INFLUENCE
DE L'EXTRAIT DE TRYPANOSOMA CRUZI
SUR DIVERS ASPECTS METABOLIQUES
DE LA CELLULE SARCOMATEUSE



Digitized by the Internet Archive
in 2026

INFLUENCE DE L'EXTRAIT DE TRYPANOSOMA CRUZI SUR DIVERS ASPECTS METABOLIQUES DE LA CELLULE SARCOMATEUSE

THÈSE

POUR LE DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE LYON
SECTION DE PHARMACIE

*présentée et soutenue publiquement
devant la Faculté Mixte de Médecine et de Pharmacie de Lyon
le 27 juin 1963*

PAR

Jacqueline MICHEL-BRUN

*Pharmacien de la Faculté de Paris
Assistante à la Chaire de Parasitologie et Pathologie Exotique
Diplômée d'Etudes Spéciales de Parasitologie,
d'Hématologie, de Bactériologie, de Sérologie.*

Née le 20 janvier 1922 à Montjay (Hautes-Alpes)



LYON
Imprimerie Sallaz
16, RUE BARODET

1963



PERSONNEL DE LA FACULTE

Doyen honoraire : M. J. LEPINE, membre de l'Institut.
Doyen : M. H. HERMANN, Correspondant de l'Institut.
Assesseurs : MM. M. LEVRAT et L. REVOL.

PROFESSEURS HONORAIRES

MM. COLLET, GUIART, PATEL, LEPINE, TRILLAT, MOURIQUAND, MAZEL, GARIN, GATE, MARTIN, GABRIELLE, SANTY, DUCLOS, GUILLEMINET.

PROFESSEURS

Physiologie A	MM. HERMANN
Clinique urologique	CIBERT
Physique biologique	PONTHUS
Clinique neuro-psychiatrique et hygiène mentale	(détaché à Beyrouth)
Thérapeutique chirurgicale et chirurgie opératoire	DECHAUME
Chimie organique et toxicologie	ROCHET
Clinique chirurgicale B	CHAMBON
Clinique médicale B	WERTHEIMER
Clinique et prophylaxie cardio-vasculaires	PAUPERT-RAVAULT
Clinique médicale C	CROIZAT
Chimie biologique et médicale	FROMENT
Clinique chirurgicale A	ENSELME
Pharmacie galénique et matière médicale	MALLET-GUY
Clinique gynécologique	REVOL
Clinique obstétricale	POLLOSSON
Médecine du travail	PIGEAUD
Clinique médicale A	BOURRET
Hygiène et action sanitaire et sociale	LEVRAT
Clinique médicale infantile et hygiène du premier âge	SOHIER
Biologie médicale et pharmacodynamie	BERNHHEIM
Botanique et cryptogamie	JOURDAN
Clinique chirurgicale C	NETIEN
Chimie analytique pharmaceutique	BERTRAND
Pharmacie chimique et pharmacologie	BADINAND
Médecine légale et déontologie	DREVON
Parasitologie et pathologie exotique	ROCHE
Clinique d'Oto-rhino-laryngologie et d'audio-phonologie	COUDERT
Clinique ophtalmologique	MOUNIER-KUHN
Clinique de dermatologie, syphiligraphie et allergologie	PAURIQUE
Clinique de pneumo-phthisiologie	THIERS
Clinique traumatologique des membres	BRUN
Clinique carcinologique	CREYSSEL
Anatomie pathologique	DARGENT
Pathologie générale et expérimentale	GUICHARD
Anatomie	GIRARD Paul
Pathologie chirurgicale	LATARJET
Thérapeutique	PEYCELON
Pathologie médicale	GIRARD Marcel
Physio-pathologie des voies respiratoires	VACHON
Radiologie	GALY
Clinique des maladies infectieuses	PAPILLON
Hydrologie thérapeutique, climatologie et écologie sociale	JEUNE
Bactériologie	GONIN
Physiologie et pathologie obstétricale	MONNET
Physiologie B	BANSILLON
Clinique endocrinologique	CHATONNET
Clinique de chirurgie orthopédique	GUINET
Clinique stomatologique	TRILLAT
Clinique de chirurgie et d'orthopédie infantiles	FREIDEL
Matière médicale et législation pharmaceutique	MARJON Joseph
Histologie et embryologie	DORCHE
	X...

PROFESSEURS A TITRE PERSONNEL

Physique nucléaire appliquée à la médecine	MM. BERGER
Bactériologie	BERTOYE
Physiologie	CIER Jean-François
Chirurgie générale	MANSUY

Professeurs en surnombre :

Pédiatrie et puériculture	MM. SARROUX
Climatologie	LACROIX
Thérapeutique chirurgicale	GOINARD
Propédeutique chirurgicale	LIARAS
Chimie pharmaceutique	COLLET

PROFESSEURS SANS CHAIRE

Parasitologie	MM. ROMAN
Pharmacie chimique et pharmacologie	CIER André
Chimie organique et toxicologie	PERROT
Histologie et embryologie	DUMONT
Anatomie pathologique	FEROLDI
Physique biologique	MORET

MAITRES DE CONFERENCES AGREGES

Neuro-chirurgie	MM. LECUIRE
Médecine générale	REVOL Louis
Chimie biologique	CREYSEL Roger
Hygiène	THIVOLET
Parasitologie	GARIN
Médecine du travail	TOLOT
Electro-radiologie	PINET
Médecine générale	DESPIERRES
Botanique et cryptogamie	ODDOUX
Chimie analytique	DE SOLLIERS
Médecine générale et thérapeutique	LEJEUNE
Chirurgie générale	REBOUILLAT
Electro-radiologie	BUFFARD
Maladies infectieuses	NAUSSAC
Pédiatrie	ROMAGNY
Stomatologie	DE MOURGUES François
Anatomie	DUROUX
Anatomie	BOUCHET
Thérapeutique	BRETTE
Anatomie pathologique	TOMMASI
Hygiène	RIFFAT
Pathologie expérimentale	JOUVET
Hématologie	JOUVET
Histologie et embryologie	FAYRE-GILLY
Chimie analytique	GIROD
Chimie biologique	MALLEIN
Physique biologique	GRAS
Bactériologie	PEYRIN
Biologie médicale et pharmacodynamie	VIALLIER-RAYNARD
Physiologie	FAUCON
	FLANDROIS

AGREGES EN EXERCICE

Médecine générale	MM. PONT	Chirurgie générale	MARET
Médecine générale	VIGNON	Chirurgie générale	DESCOTES
Médecine générale	PLAUCHU	Chirurgie générale	MICHOULIER
Médecine générale	TRÆGER	Obstétrique	BURTHIAULT
Médecine générale	DEVIC	Obstétrique	DUMONT Martial
Médecine générale	GARDE	Obstétrique	GARMIER
Médecine générale	PERRIN André	Oto-rhino-laryngologie ..	GIGNOUX
Médecine générale	LARBRE	Oto-rhino-laryngologie ..	GAILLARD
Médecine générale	MORNEX	Pédiatrie et puériculture	FRANÇOIS
Médecine générale	NORMAND	Pédiatrie et puériculture	BETHENOD
Médecine générale	FRIES	Dermatologie	COLOMB
Médecine générale	LAMBERT	Médecine légale	COLIN
Médecine générale	NOEL Gilbert	Neuro-psychiatrie	GUYOTAT
Médecine générale	ROBERT	Neuro-psychiatrie	SCHOTT
Chirurgie générale	MARION Pierre	Ophtalmologie	BONAMOUR
Chirurgie générale	MICHAUD	Ophtalmologie	HUGONNIER
Chirurgie générale	JAUBERT	Urologie	DURAND
	DE BEAUJEU	Electro-radiologie	CHASSARD
Chirurgie générale	SAUTOT	Neuro-chirurgie	ALLEGRE
Chirurgie générale	GUILLEMIN	Orthopédie	FAYSE
Chirurgie générale	de MOURGES G.	Orthopédie	SCHNEPP
Chirurgie générale	FRANCILLON	Pneumo-phthisiologie	KALB
Chirurgie générale	SAUBIER	Stomatologie	DUMAS

EXAMINATEURS DE LA THESE :

Professeur J. COUDERT, Professeur REVOL, Professeur NETIEN, Professeur CIER

La Faculté de Médecine de Lyon déclare que les opinions émises dans les dissertations qui lui sont présentées doivent être considérées comme propres à leurs auteurs et qu'elle n'entend leur donner ni approbation, ni improbation.

A MES PARENTS

A NOTRE PRESIDENT DE THESE

MONSIEUR LE PROFESSEUR J. COUDERT

Instigateur de cette Thèse, il nous a guidée à travers une recherche ardue et passionnante, et nous a fait le très grand honneur de nous associer à ses travaux.

Qu'il veuille bien trouver ici l'assurance de notre profonde reconnaissance et l'expression de notre respectueuse admiration.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR REVOL

Avec nos sentiments profondément respectueux et l'expression de notre reconnaissance pour la bienveillance qu'il nous a témoignée.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR NETIEN

Notre profond respect.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR CIER

Avec nos sentiments de respect et de reconnaissance pour les conseils qu'il nous a prodigués.

A MONSIEUR LE PROFESSEUR J. P. GARIN

Avec l'expression de notre reconnaissance pour la bienveillance et la cordialité qu'il nous a toujours témoignées.

A MADEMOISELLE LE DOCTEUR BATTESTI

Chef de Travaux à la Faculté de Médecine

A MADAME SIMON

A MES CAMARADES
DU LABORATOIRE DE PARASITOLOGIE

A NOS MAITRES DE LA FACULTE DE PARIS

A MONSIEUR LE DOCTEUR MERIEUX

A MONSIEUR LE DOCTEUR TRIAU

A MONSIEUR LE DOCTEUR BASTIEN

A MONSIEUR LE DOCTEUR NICOLAS

A MONSIEUR LE DOCTEUR TROUYEZ

Pour l'aide matérielle et les conseils
qu'il nous ont apportés dans l'élabora-
tion de ce travail.

INTRODUCTION

La médication Trypanosomienne dans le traitement de certains cancers constitue une méthode originale qui ne présente aucun point commun avec la thérapeutique classique.

Elle paraît déclencher un processus de normalisation du métabolisme vicié de la cellule tumorale en interférant au niveau des mécanismes fondamentaux de la biologie cellulaire. A cette conclusion identique ont abouti parallèlement les recherches menées à la fois en France et en U.R.S.S.

En 1931, WARBURG démontrait la déviation anaérobie du métabolisme tumoral. En 1958, divers auteurs anglo-saxons remarquaient certains rapports constants entre le taux d'enzyme lactique et la maladie cancéreuse.

Ces observations nous ont incitée à rechercher par quel mécanisme biochimique l'extrait de *Trypanosoma Cruzi*, en redressant l'état clinique des malades, corrigeait en même temps certains systèmes enzymatiques perturbés.

C'est pourquoi la première partie de ce travail a porté sur l'étude de ceux-ci.

Les conclusions que nous avons tirées de l'étude des systèmes enzymatiques de la glycolyse, rapprochées des observations d'autres chercheurs, ont montré l'extension de ce processus de normalisation aux divers paliers métaboliques perturbés.

Il était normal de remonter à un mécanisme organisateur commun d'ordre plus élevé.

Les travaux récents sur le déterminisme de la mutation néoplasique semblent mettre en cause une transformation du potentiel nucléaire. Nous avons donc cherché, dans la seconde partie de nos travaux, à mettre en évidence les modifications des acides nucléiques.

Nous avons utilisé deux méthodes destinées à se recouper :

— les modifications qualitatives des colorations de fluorescence, caractéristiques du noyau des cellules néoplasiques, par la méthode à l'Acridine-Orange ;

— les modifications quantitatives des acides nucléiques, appréciées par les dosages classiques de l'acide désoxyribonucléique et ribonucléique.

Les résultats différents obtenus par ces méthodes nous ont suggéré des hypothèses sur le mécanisme intime d'action de l'extrait de Trypanosome. Nous les livrons comme conclusion de notre travail.

PREMIERE PARTIE

HISTORIQUE

En juillet 1931, le professeur ROSKIN du laboratoire de Cytologie expérimentale de l'Université de Moscou inoculait simultanément à divers lots de souris le sarcome d'Ehrlich et l'agent infectieux de la Trypanosomiase sud-américaine, le *Trypanosoma cruzi*.

Le choix de la maladie de Chagas avait été déterminé en raison de l'organotropisme du parasite, ROSKIN avançant l'hypothèse que la tumeur pouvait représenter pour les formes leishmania du parasite un lieu d'élection favorable, tout comme chez l'individu exempt d'affection néoplasique, il se concentre dans le myocarde et la glande thyroïde.

L'hypothèse se confirma : il constata une involution tumorale et en plus, une action cytolytique sur les cellules néoplasiques. D'autres expérimentations menées avec *T. Equiperdum*, *Sp. recurrentis* et divers agents parasitaires montrèrent que ceux-ci n'avaient *aucun effet* antitumoral.

ROSKIN conclut que le *T. Cruzi* était doué d'une action spécifique. A l'époque, *il songea à la mise en jeu* d'un phénomène caryotoxique en raison des signes de dégénérescence observés dans le noyau.

Le phénomène s'observant également dans les cellules non parasitées voisines, il attribua *tous ces faits* à l'existence d'une « endotoxine trypanosomienne » siégeant dans le

cytoplasme du parasite. Les extraits filtrés de lysats de Trypanosomes reproduisant les mêmes effets, il démontre ainsi que l'action du *Trypanosoma Cruzi* n'était pas le fait d'un simple tumorotropisme.

Les travaux des savants moscovites ROSKIN et KLYUEVA avaient déjà permis de dégager certaines notions essentielles qui situaient la nouvelle thérapeutique anticancéreuse sous un angle foncièrement différent de celui de la chimiothérapie classique. « L'endotoxine trypanosomienne » agissait comme un normalisateur du métabolisme vicié de la cellule tumorale.

Les travaux de WARBURG en 1931 avaient montré la déviation de celle-ci vers l'anaérobiose. ROSKIN et KLYUEVA démontrèrent que les extraits de trypanosome restauraient les processus aérobie.

En France, dès 1944, le Professeur COUDERT reprit l'ensemble de la question.

Il remarquait tout d'abord que l'inoculation chez le néoplasique de la maladie de Chagas donnait lieu à une régression tumorale très relative. Cela en raison de la pullulation parasitaire qui n'est jamais très élevée.

Il s'attacha en premier lieu à sélectionner une souche active, puis à stabiliser et à standardiser l'extrait de trypanosome. La lyophilisation s'avéra garantir l'intégrité du principe actif, protéine thermolabile, instable en solution aqueuse.

Ses travaux sur le sarcome greffé du rat (1950) mettent l'accent sur la nécessité d'un traitement précoce et soulignent l'importance du potentiel évolutif de la tumeur (COUDERT et JUTTIN).

Il note l'action complexe sur les cellules tumorales :

— un stade de modification cytologique avec affaiblissement de l'hyperchromatisme, diminution de l'indice

nucléo-plasmatique. diminution du nucléole, modifications qui sont parallèles à la normalisation des échanges métaboliques ;

— un stade de réaction histocytaire et macrophagique avec élimination des cellules tumorales.

Le principe actif paraît se rattacher à un facteur enzymatique dont l'action temporaire et réversible justifie les traitements réguliers qui devront être prolongés par voie parentérale, jusqu'à élimination totale des cellules malignes. Les travaux sur le sarcome T8 de Guérin et le carcinome d'Ehrlich font état de l'involution tumorale chez les animaux traités (Congrès de Lisbonne, 1958), et soulignent l'importance de l'âge, du volume, du potentiel évolutif de la tumeur, et la nécessité d'un traitement précoce (COUDERT et Mlle BATTESTI).

Les résultats obtenus en clinique humaine cadrent avec les notions expérimentales : sédation des algies, diminution des hémorragies en nappe, phénomènes en rapport avec le remaniement histologique, puis involution tumorale. Les néoplasmes les plus sensibles sont les tumeurs des ovaires, du rein, du sein, de la langue, du larynx et de l'estomac. Le principe actif est d'une totale innocuité, pour les tissus sains.

Toutes ces notions sont exposées lors du Congrès, sur la Maladie de Chagas, à Rio-de-Janeiro, en 1959, par le professeur J. COUDERT. Ces observations cliniques rejoignent celles des auteurs soviétiques (SVIATOUKHINE, 1957) et sont rassemblées dans le livre de ROSKIN et KLYUEVA (1946 et 1957).

Une nouvelle étape de recherches sur le mode d'action se déroule parallèlement.

Les travaux entrepris en 1960 par le Professeur COUDERT et Mlle le Docteur M. R. BATTESTI sur la réduction de l'indice mitotique des cellules KB, en présence

d'extract trypanosomien, démontrent l'interférence directe de ce dernier au sein du métabolisme nucléaire. Ce fut une notion importante qui devait conduire à préciser le mode d'action.

Parallèlement en U.R.S.S., les recherches de KLYUEVA et ROSKIN (1956) avaient porté sur le carcinome d'Ehrlich, le Sarcome 180, le carcinome du Rat, le cancer de Brown-Pearce du Lapin : toutes ces formes de tumeurs s'étaient montrées sensibles aux extraits trypanosomiens.

Ces auteurs avaient également remarqué les profondes modifications nucléocytoplasmiques. Puis, TRUFANOW et PALKINA (1960) firent porter leurs recherches sur les actions fermentaires intracellulaires, et mirent en évidence l'abaissement de la succino-déshydrogénase et l'augmentation de la cytochrome oxydase au sein d'un homogénéisat de sarcome de Croker soumis à l'action de l'extract.

Dès 1945, aux U.S.A., des recherches étaient entreprises par HAUSCHKA et GOODWIN. Opérant sur des Souris atteintes de diverses formes de tumeurs, sarcomes ou adénocarcinomes, d'abord par infestation au moyen de diverses souches de *Trypanosoma cruzi*, puis par injection intrapéritonéale de cultures centrifugées et lysées, ils concluent à l'inefficacité de la thérapeutique trypanosomienne. D'autres travaux menés par HAUSCHKA, LEROY et BLAIR sur l'adéno-carcinome mammaire de la Souris conduisent cependant à quelques résultats positifs (1948). Ces phénomènes d'involution sont cependant interprétés par les auteurs comme n'étant pas spécifiques de l'action du *T. cruzi*.

SPAIN, MOLOMUT et WARSCHAW, du Centre de Recherches de Brooklyn, remarquent un certain degré d'inhibition du carcinome spontané de la mamelle, chez la Souris traitée par injections de lysat trypanosomien. Déjà MALISOFF, en 1947, avait remarqué dans 55 % des cas des régression partielles ou totales du carcinome de la mamelle chez la Souris traitée par un lysat de *Trypanosomes*.

Mais, devant la divergence des résultats obtenus, les auteurs américains ne poursuivirent pas les recherches. L'utilisation de lysats non standardisés, préparés à partir de souches plus ou moins actives expliquait pour une part la discordance de leurs conclusions, d'autre part, les protocoles d'observation s'obstinaient à rechercher une action cytotoxique globale très différente de l'action métabolique mise en évidence par les chercheurs russes et français.

En Amérique du Sud, les interférences cancer - maladie de Chagas n'ont pas retenu d'une façon particulière l'attention des chercheurs. Cependant, l'observation de TALICE, PICK et PEREZ MOREIRA, à Montevideo, en 1954, est assez suggestive : l'inoculation intra-péritonéale de *T. cruzi* à plusieurs néoplasiques dont l'état avancé ne permettait plus l'intervention chirurgicale, fut suivie d'une certaine amélioration clinique. TALICE fit également observer que la biothérapie trypanosomienne ne peut atteindre à sa pleine efficacité que dans une utilisation au stade précoce de la maladie tumorale.

TORREALBA en 1962, et Jorge HOMEZ poursuivent actuellement au Venezuela différents travaux, mais les conclusions, bien qu'intéressantes en ce qui concerne les cellules HeLa et KB, ne sont pas encore formellement dégagées.

Au Brésil, où des études statistiques ont été faites, et où le taux d'endémie de la Maladie de Chagas atteint 17 %, on note l'absence d'infection trypanosomienne chez les cancéreux.

En France, il faut souligner la thèse de RUDALI (Paris, 1942), inspirée par BRUMPT, purement expérimentale, qui reste très limitée dans ses moyens d'investigation, puis les observations cliniques de GALLIARD, BRUMPT et MARTINEZ qui font état de résultats irréguliers après inoculation de la maladie de Chagas. Ils notent cependant la sédation des algies et une certaine rétrocession tumorale.

Enfin, les thèses de FARAH (Lyon, 1950), SPADOTTO (Paris, 1958), GASIGLIA (Marseille, 1961), P. L. MARIA (Paris, 1961), dont les conclusions se rejoignent, laissent entrevoir d'encourageantes perspectives thérapeutiques dans le domaine clinique, par l'utilisation des extraits lyophilisés du commerce.

LES ENZYMES GLYCOLYTIQUES

Parmi les nombreux enzymes contenus dans le sérum, quelques-uns seulement ont été isolés et ont fait l'objet d'études particulières quant à leur structure et aux possibilités de leur dosage. Ainsi, la L.D.H., les phosphatases acide et alcaline, les transaminases, l'amylase, la fibrinolysine ont été dosées.

En général, leurs variations pathologiques ne constituent pas le critère d'une affection déterminée : le défaut d'un enzyme peut être à l'origine d'une manifestation pathologique relevant de diverses causes :

- défaut de synthèse par altération de l'organe (diabète) ;
- absence congénitale de certains enzymes par mutation génétique ;
- altération acquise par mutation des potentialités de certaines cellules (cas des cellules néoplasiques).

Des fluctuations enzymatiques qui demeurent constantes dans tel ou tel syndrome, constituent des points de repère que l'on ne saurait négliger.

Dans la maladie cancéreuse, l'augmentation de la L.D.H. paraît être un fait assez constant.

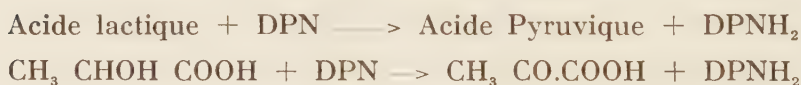
L'étude de sa structure et de son métabolisme ont suscité de nombreux travaux.

Nous avons cherché à connaître ses fluctuations dans les domaines clinique et expérimental, sous l'effet de l'extrait de trypanosome, en essayant de préciser le mode d'action de celui-ci.

LA DESHYDROGENESE LACTIQUE (L.D.H.)

C'est une oxydo-réductase appartenant au groupe des phérases. Formée d'un Apo-enzyme la protéine C et d'un Co-enzyme le Diphosphopyridine Nucléotide, elle assure le transfert de l'hydrogène du donneur à l'accepteur. Le Co-enzyme sert de transporteur et passe alternativement de la forme réduite à la forme oxydée.

La L.D.H. est l'enzyme de la fermentation lactique et sa spécificité s'inscrit dans l'équation :



La destinée de l'acide pyruvique, dernier terme des processus de phosphorylation du glucose selon le schéma d'Emden-Meyerhof, sera différente selon la voie empruntée.

En aérobiose, l'acide pyruvique sera métabolisé dans le cycle de Krebs.

En anaérobiose, deux processus différents peuvent se manifester :

1° La décarboxylation qui préludera à la fermentation alcoolique ;

2° La réduction en acide lactique : c'est la fermentation lactique que l'on retrouve en physiologie, dans la contraction musculaire et les syndromes anoxémiques.

I. — Les recherches effectuées à l'étranger :

La structure de la L.D.H. et ses variations ont fait l'objet de multiples recherches à l'étranger. La fréquence de son augmentation dans la maladie cancéreuse paraît constituer une notion importante, aussi bien du point de vue de l'évolution de la maladie que de son diagnostic précoce.

En 1924, le savant anglais HILL remarquait une augmentation de l'enzyme glycolytique dans le sérum de certains néoplasiques. Quelques années plus tard, il apportait deux notions nouvelles : les cellules sarcomateuses possèdent une teneur élevée en L.D.H. Mises en suspension dans une solution saline isotonique, elles confèrent au milieu ambiant, une forte activité enzymatique.

WROBLEWSKI (1957) et KING (1961) confirmèrent l'augmentation de la L.D.H. dans les sérums néoplasiques et montrèrent aussi que certains états liés à des phénomènes d'anoxémie s'accompagnaient de la même anomalie.

En 1955, WROBLEWSKI et CABAUD mirent au point une méthode de dosage dans le sérum. Ils définirent l'unité WROBLEWSKI. Le taux normal d'enzyme demeure compris entre 200 et 500 unités. Chez les cancéreux, il peut atteindre 2.000 unités.

Les auteurs anglais se référant aux observations antérieures de HILL sur le taux élevé d'enzyme dans le milieu nutritif d'une suspension de cellulose sarcomateuses, songèrent à mesurer la L.D.H. d'exsudats inflammatoires, de sérosités pleurales ou péritonéales de divers malades, les uns néoplasiques, les autres atteints de certaines formes de tuberculose pulmonaire, d'emphysème, d'infarctus du myocarde.

L.D.H. sérosité

Etablissant le rapport ————— ils constatèrent
L.D.H. sérique

un rapport supérieur à un chez les néoplasiques. Il en était de même chez certains malades atteints de syndromes anoxémiques.

Les travaux de WARBURG en 1928 à Berlin, sur le carcinome de Flexner, le sarcome de Rous, le sarcome du Rat de Jensen, s'attachaient à l'étude des réactions productrices d'énergie permettant d'expliquer la croissance tumorale.

Dissociant à l'époque, la respiration et la fermentation, il remarquait l'activité glycolytique intense des tissus cancéreux, en même temps que leur respiration affaiblie.

Il concluait à l'orientation vers l'anaérobiose du métabolisme tumoral, conclusion nuancée toutefois. Ainsi, écrivait-il : « Je résume brièvement ce que je tiens pour essentiel : le métabolisme de la cellule cancéreuse est au total en partie un métabolisme fermentaire ; en partie un métabolisme d'oxydation ».

Ainsi, la concurrence des enzymes de la glycolyse aérobie et de la glycolyse anaérobie, l'effet Pasteur, vont se manifester dans la complexité de certains phénomènes.

Les auteurs anglais pressentirent qu'un processus d'anaérobiose lié à une augmentation de la L.D.H., laissait suspecter un foyer tumoral. Toutefois, ils ne formulèrent pas de conclusion.

Il n'en fut pas de même des auteurs soviétiques ROSKIN et KLYUEVA. Leurs travaux centrés depuis 1938, sur le tumorotropisme du *Trypanosoma cruzi*, les amenèrent à mettre en évidence un principe actif antinéoplasique, dont le mode d'action très particulier entraîne des modifications cytologiques singulières. Ils démontrèrent au moyen de l'appareil de Warburg, la restauration du métabolisme aérobie de la cellule tumorale. Parallèlement, des résultats cliniques encourageants furent notés chez de nombreux malades.

II. — L'Etude Clinique.

Tous ces faits nous ont incitée à étudier tout d'abord *les modifications du taux de la L.D.H., chez les malades soumis à des traitements réguliers d'extrait trypanosomien.*

Méthode de dosage : Il est basé sur la méthode de CABAUD et WROBLEWSKI.

1° *Principe :* L'acide pyruvique en présence de dihydrodiphosphopyridine nucléotide réduit (D.P.P.N.) est transformé sous l'influence de la déshydrogénase lactique (L.D.H.), en acide lactique.

La quantité d'acide pyruvique transformée en acide lactique est directement proportionnelle à l'activité (quantité de l'enzyme).

Dans la méthode de CABAUD et WROBLEWSKI, le pyruvate non transformé est dosé par la réaction colorée qu'il donne avec le 2-4 dinitrophénylhydrazine.

L'acide lactique et le D.P.P.N. réduit ou oxydé, n'interfèrent pratiquement pas dans l'intervalle de longueur d'onde choisie pour le dosage.

Par conséquent, si l'on part d'une solution de pyruvate étalonnée, donnant en présence de 2-4 dinitrophénylhydrazine, une densité optique bien déterminée, que l'on fasse agir sur cette solution la L.D.H., il y aura transformation de pyruvate et par conséquent une baisse de la densité optique. Cette baisse sera d'autant plus forte que la L.D.H. sera présente en plus grande quantité.

2° *Réactifs :*

N° 1 : Substrat Pyruvate : solution de pyruvate de sodium tamponnée à pH 7,5.

N° 2 : (D.P.P.N.) Di-hydrodiphosphopyridine nucléotide réduit : chaque flacon renferme exactement 1 mmg

de di-hydrodiphosphopyridine nucléotide. La réaction enzymatique s'effectuera directement dans le flacon.

N° 3 : Solution de 2-4 dinitrophénylhydrazine dans l'acide chlorydrique.

N° 4 : Solution d'hydroxyde de sodium 0,4 N.

Remarques : Les réactifs n° 1 et 2 doivent être conservés au réfrigérateur. Le réactif n° 1 renferme du chloroforme comme agent conservateur. Eviter d'en pipeter des gouttelettes lors de l'emploi. A la sortie du réfrigérateur et par suite de changement de température, le chloroforme peut occasionner un louche dans le flacon. Attendre qu'il se dissipe. Le réactif n° 3 doit être conservé à l'obscurité.

3° Technique.

A. — *Définition des unités :* WROBLEWSKI a défini l'unité de L.D.H. comme la quantité d'enzyme susceptible de produire à 25° une baisse de densité optique, mesurée à 3.400 Å de 0,001 par minute.

Le fait d'effectuer la réaction à 37°, n'apporte pas de modification appréciable.

B. — *Etablissement de la courbe d'étalonnage :*

— préparer les dilutions suivantes : 6 tubes contenant des quantités décroissantes de réactif n° 1 correspondent à :

Tube n° 1	—	0	unité de L.D.H. par ml de sérum
Tube n° 2	—	280	unités —
Tube n° 3	—	640	— —
Tube n° 4	—	1.040	— —
Tube n° 5	—	1.530	— —
Tube n° 6	—	2.000	— —

— ajouter à chaque tube 1 ml de réactif n° 3, mélanger et laisser 20' à la température du laboratoire.

— ajouter dans chaque tube 10 ml de soude 0,4 N ; mélanger et laisser 30' à la température du laboratoire.

— colorimétrer en prenant pour blanc un tube d'eau distillée, la longueur d'onde choisie sera comprise entre 4.000 et 5.500 Å.

— Tracer la courbe d'étalonnage.

C. — *Dosage de la L.D.H.* :

a) ajouter dans un flacon de réactif n° 2 (D.P.P.N.) 1 ml de réactif n° 1 (substrat pyruvate). Porter le flacon au bain-marie à 37°, pendant au moins 5 minutes ;

b) ajouter 5 parties d'eau distillée à une partie du sérum à tester. Mettre 0,1 ml de cette solution dans le flacon. Remettre le bouchon de caoutchouc et bien mélanger par retournements. Porter le flacon au bain-marie à 37°, pour 30 minutes exactement ;

c) retirer le flacon du bain-marie et ajouter immédiatement 1 ml de réactif n° 3. Mélanger et laisser pendant 20 minutes à la température du laboratoire ;

d) ajouter 10 ml de soude 0,4 N. Mélanger et laisser pendant 30 minutes à la température du laboratoire ;

e) transférer le liquide dans un tube à colorimétrer et faire la lecture à la longueur d'onde choisie, en prenant pour blanc un tube d'eau distillée.

D. — *Calculs* :

Lire sur la courbe le nombre d'unités.

Si ce chiffre dépasse 2.000, faire une nouvelle dilution au 1/5^e à partir de celle que l'on a déjà effectuée,

multiplier ensuite par 5, la valeur obtenue. Le nombre d'unités L.D.H. s'exprime par ml de sérum.

Les sérums qui ont été examinés provenaient de patients atteints de diverses formes de cancer. Presque tous présentaient un taux élevé de L.D.H. Certains cependant se caractérisaient par une inversion paradoxale, un taux très faible d'enzyme coïncidant avec une forme anatomiquement évolutive.

Nous considérerons le cas le plus général, c'est-à-dire l'augmentation. Lorsque le traitement est suffisant et prolongé, on constate toujours un abaissement de la L.D.H., allant de pair, avec une amélioration clinique.

OBSERVATIONS CLINIQUES

Madame CA... Germaine : 56 ans.

Evolution probable depuis 1950-1951 :

Epithélioma glandulaire du sein.

1954 : amputation du sein, curage axillaire. Régulièrement surveillée, rien à signaler dans l'intervalle.

1961 : douleurs lombaires et pelviennes.

Octobre 1961 : Hormonothérapie : Androtardyl 250 mg. Radio : évolution d'une ostéose néoplasique de la hanche gauche et de l'omoplate.

22-1-1962 : depuis 20 jours, Androtardyl quotidiennement.

LDH = 290 u.

L'Androtardyl est espacé : tous les 5 jours, puis tous les 10 jours.

28-2-1962 : LDH = 640 u.

On repasse à l'Androtardyl tous les 5 jours, puis tous les 10 jours.

Trypanosa : 2 ampoules tous les 2 jours.

4- 4-1962 : LDH = 180 u

26- 4-1962 : 230 u

31- 8-1962 : 230 u

5-11-1962 : 45 u

Monsieur BELT... : 60 ans.

Epithélioma Spinocellulaire de la langue.

Evolution depuis janvier 1958.

Rayons X et radium de 1958 à 1960.

Mars 1961 : Nodules de perméation cutanée ; stabilisation des lésions de la langue.

Mars 1962 : Reprise évolutive : Endoxan. Hypoleucocytose.

Avril 1962 : Traitement au Trypanosa : 2 ampoules tous les deux jours.

Mai 1962 : LDH 330 unités.

Août 1962 : Arrêt de l'évolution ; régression des nodules cutanés ; arrêt du traitement au Trypanosa.

Septembre 1962 : LDH 995 u.

Décembre 1962 : Reprise du traitement pendant 4 semaines ; état cutané stationnaire ; pas d'évolution dans la région de la langue.

11 janvier 1963 : Discrète reprise de l'extension des lésions cutanées ; stabilisation dans la région de la langue ; LDH 900 u ; reprise du traitement Trypanosa : 2 ampoules tous les 2 jours.

Monsieur PAS... R., : 37 ans.

Epithélioma Malpighien du larynx.

Evolution depuis le début de septembre 1959. Laryngectomie : Pr MOUNIER-KUHN, 9-12-1959. Radiothérapie jusqu'à la fin mars 1960.

Traitement au Trypanosa commencé le 9-1-1960 : 2 ampoules par jour, et continué sans interruption jusqu'au 22-9-1960, puis à 2 ampoules tous les deux jours. Etat local excellent, état général excellent. V.S. normale : 5 à 15.

6- 1-1962 : LDH 2000 u.

16- 1-1962 : Amygdalectomie.

29- 1-1962 : Découverte d'un ganglion cervical droit.

6- 2-1962 : Curage ganglionnaire : ganglion néoplasique avec zones de nécrose et réactions inflammatoire.

24- 2-1962 : Radiothérapie (2000 r). Trypanosa : 2 ampoules par jour.

3- 3-1962 : LDH 540 u.

- 24- 3-1962 : LDH 220 u.
22- 6-1962 : LDH 250 u.
11- 9-1962 : LDH 350 u. VS = 7,50 %. G.R. 5.100.000.
G.B. 4.800.
31-10-1962 : LDH 100 u.
12- 1-1963 : LDH 180 u.
27- 3-1963 : LDH 150 u.

Madame BI..., 54 ans.

Epithélioma glandulaire du sein.

1956 : Opération de Halsted ; surveillée cliniquement de façon régulière ; malade nerveuse et inquiète.

- 2- 2-1962 : LDH 880 u. Examen clinique. Radio osseuse. Rien à signaler. Mise à Ermalone tous les 2 jours. Trypanosa, 2 ampoules par jour.

- 26- 2-1962 : LDH 300 u.

- 23- 3-1962 : LDH 170 u.

- 6- 5-1962 : arrêt du traitement pour métrorragies ; cytologie vaginale : examen négatif. Type œstrogénique faible. Cellules intermédiaires à maturité. Index acidophile, 7 %.

- 9- 5-1962 : LDH 170 u.

- 19- 5-1962 : Trypanosa, 2 ampoules tous les deux jours pendant un mois. Traitement psychasthénique.

- 6- 7-1962 : LDH 170 u, sans traitement au Trypanosa.

- 18- 9-1962 : LDH 170 u, sans traitement au Trypanosa.

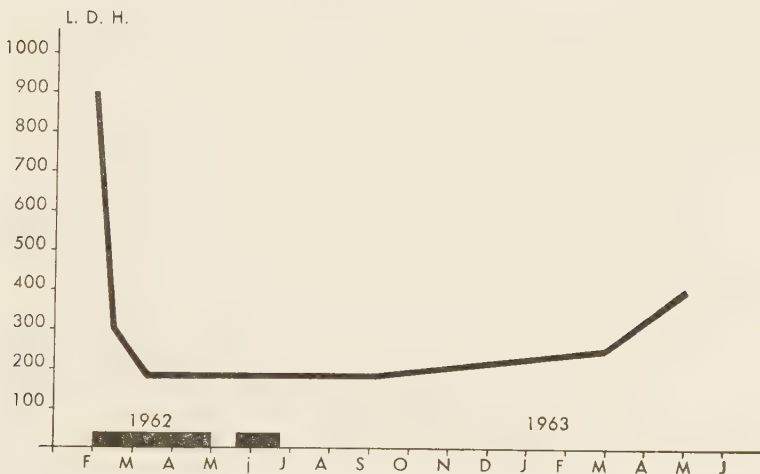
- 9- 3-1963 : LDH 230 u, sans traitement au Trypanosa.

- 27- 5-1963 : LDH 450 u, sans traitement au Trypanosa.

Madame Ca...



Madame Bi...



Ces courbes montrent que l'abaissement du taux d'enzyme est fonction d'un traitement régulier. Qu'un arrêt prématuré se traduit par un nouvel accroissement du taux de L.D.H., allant de pair avec la reprise du processus évolutif. Le mode d'action de l'extrait est de type enzymatique. Sa réversibilité en est la preuve. Le traitement devra être poursuivi jusqu'à ce que les cellules tumorales, modifiées dans leur structure et leur métabolisme, deviennent l'objet d'une agression et d'une élimination par les forces de défense humorales et tissulaires.

Afin de préciser le phénomène en partant des données cliniques précédentes, nous avons étudié le taux de la L.D.H. libérée dans le milieu nutritif, par des cellules sarcomateuses, mises en contact de quantités croissantes d'extrait filtré et lyophilisé de Trypanosome.

Cette recherche a l'avantage de faire abstraction des phénomènes secondaires, dus aux réactions de défense de l'organisme.

III. — Etude Expérimentale de la L.D.H. Sarcomateuse.

a) *Le carcinome d'Ehrlich : l'aspect cytologique.*

D'une réalisation facile, le carcinome d'Ehrlich permet l'inoculation d'importants lots de souris, assurant ainsi une réserve de cellules cancéreuses, dans un milieu physiologique optimum.

L'inoculation intrapéritonéale de cellules sarcomateuses à la souris, se traduit par une ascite qui se développe après un temps de latence de 4 à 5 jours : Evolution progressive, qui atteint un volume de 10 à 15 ml en phase terminale.

D'un aspect d'abord opalescent puis blanchâtre, le liquide d'ascite devient ensuite hémorragique, tandis que l'animal évoluant vers la cachexie, meurt vers la 3^e semaine.

La cellule sarcomateuse est arrondie, d'une taille supérieure à la normale : 20 à 30 μ . Elle possède un important noyau hyperchrome, boursoufflé par des ébauches de mitose, pourvu d'un seul ou de plusieurs nucléoles volumineux. Le cytoplasme peut être réduit à une simple zone marginale. Plus abondant, il est souvent le siège d'une dégénérescence vacuolaire.

b) *Protocole expérimental.*

1° *La préparation de la suspension cellulaire :*

Nous avons choisi comme milieu nutritif le liquide de Tyrode, modifié comme suit :

10 cc de liquide de Tyrode.

1 cc de sérum humain stérile.

IV gouttes de $\text{PO}_4 \text{H}^2\text{K M}/5$ afin d'amener le pH à 7.

Prélèvement stérile de l'ascite de souris : (les animaux présentant des hémorragies péritonéales sont éliminés). Ne sont gardés que les liquides d'ascite opalescents.

Dilution au 1/10^e du liquide d'ascite dans le liquide de Tyrode modifié. Cette dilution au 1/10^e, en général d'une extrême richesse cellulaire, rend la numération impossible. Elle est diluée au 1/100^e. A partir de cette deuxième dilution qui est numérée à l'hématimètre de Malassez, on prépare la *suspension cellulaire définitive* à 25 millions de cellules/ml.

2° *L'Extrait de Trypanosome.*

L'extrait filtré et lyophilisé a été utilisé. Le contenu d'une ampoule qui correspond à 3.630 millions de trypanosomes est dissous dans 2 ml de liquide de Tyrode modifié. En utilisant le milieu nutritif des cellules, on évite toute modification dans le pH et l'équilibre osmotique.

Cette solution constituera la solution mère, à partir de laquelle sera faite la 1^{re} dilution.

3° *Les Dilutions.*

Dans les tubes à hémolyse stérile, contenant des quantités égales de suspension cellulaire à 25 millions de cellules par ml, sont effectuées quatre dilutions logarithmiques d'extrait :

1/10 1/100 1/1.000 1/10.000.

Le 5^e tube constitue le témoin. Les dilutions sont faites avec les plus grandes précautions, afin de ne pas traumatiser les cellules.

4° *L'incubation.*

Les cinq tubes sont portés à l'incubation au bain-marie à 37° pendant 3 heures. Ils sont ensuite centrifugés à 3.000 tours/minute, pendant trois minutes.

Sur chacun des liquides surnageants, dont le pH est 7,5, on effectue le dosage de la L.D.H.

5° *Le Dosage.*

On suit la technique précédemment indiquée avec toutefois une petite modification : la dilution au 1/5^e, nécessaire pour le dosage de la L.D.H. sérique, n'est pas effectuée. Le taux de L.D.H. libéré par 75 millions de cellules, serait alors trop faible pour être détecté.

6° *Résultats*. Commentaires sur l'allure générale des courbes.

a) Le mode d'action des extraits trypanosomiens :

La courbe moyenne de 10 essais effectués dans les conditions précédemment décrites, montre :

— *une réduction du taux de L.D.H., proportionnelle à la concentration de l'extrait s'inscrivant selon une relation de type linéaire.*

On remarque que les *concentrations comprises entre 1/1.000 et 1/10.000, définissent une zone optimum d'activité.*

L'ensemble de la courbe traduit un phénomène d'ordre enzymatique. Trois faits supplémentaires viennent corroborer ce point de vue :

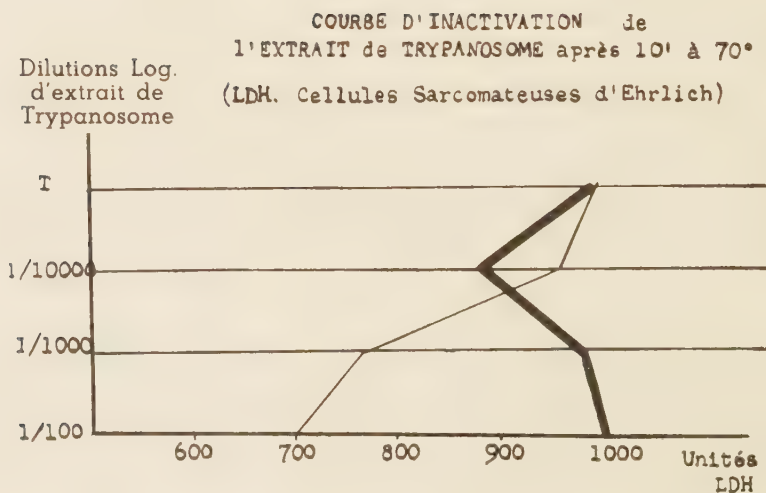
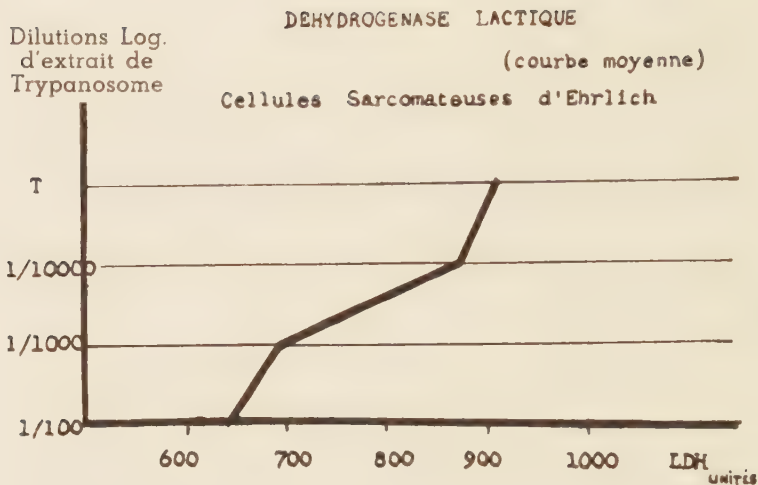
- L'inactivation de l'extrait par la chaleur.
- L'inactivation de l'extrait par le vieillissement.
- Sa nature protéique.

b) La nature enzymatique des extraits.

1) L'inactivation par la chaleur : une ampoule d'extrait reprise par 2 ml de liquide de Tyrode, est chauffée au bain-marie pendant dix minutes à 70°. Selon les conditions expérimentales déjà décrites, le dosage de la L.D.H. est effectué sur une suspension de cellules sarcomeuses (25 millions par ml) après addition aux tubes de la gamme de dilutions logarithmiques de lysat chauffé. Un 4^e tube constitue le témoin.

1/100	1/1.000	1/10.000	T
520	510	460	520 = Courbe d'inactivation

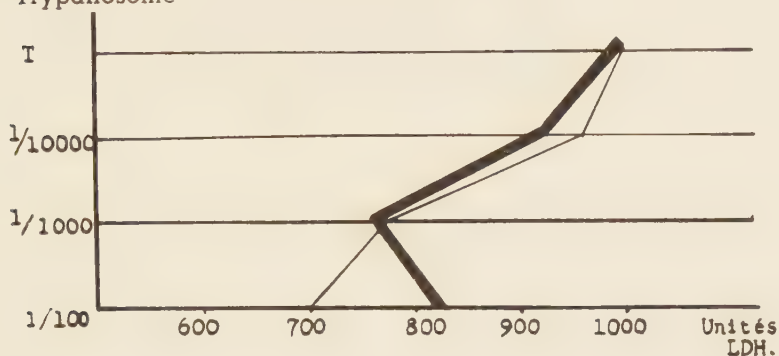
2) L'inactivation par le vieillissement : trois ampoules d'extrait reprises chacune par 2 ml de liquide de Tyrode, sont placées dans les conditions expérimentales suivantes :



Courbe d'Inactivation de l'Extrait
de Trypanosome après 3 jours à + 4°

Dilutions Log.
d'extrait de
Trypanosome

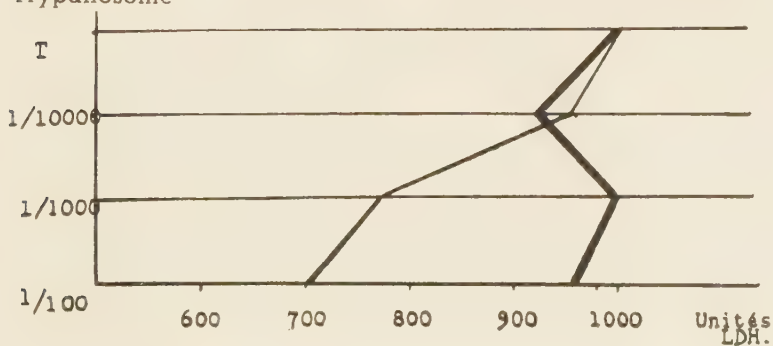
(LDH. Cellules Sarcomateuses d'Ehrlich)



COURBE d'INACTIVATION DE L'EXTRAIT
de Trypanosome après 6 jours à + 25°

Dilutions Log.
d'extrait de
Trypanosome

(LDH-Cellules Sarcomateuses d'Ehrlich)



la 1 ^{re}	est maintenue trois jours à	+	4°
la 2 ^e	—	trois	— + 25°
la 3	—	six	— + 25°

Dosage de la L.D.H. du surnageant, selon le mode habituel, après addition aux tubes de la gamme des extraits vieillis.

Résultats :

1 ^{re} gamme :	1/100	1/1.000	1/10.000	T
	420	390	470	510

Extrait 3 jours à + 4° : inactivation partielle.

2 ^e gamme :	420	510	330	500
------------------------	-----	-----	-----	-----

Extrait 3 jours à + 25° : inactivation presque complète.

3 ^e gamme :	720	700	750	730
------------------------	-----	-----	-----	-----

Extrait 6 jours à + 25° : inactivation complète.

Le principe actif est donc labile.

c) La nature protéique du Principe actif.

L'étude électrophorétique a révélé une fraction protéique réduite migrant vers l'anode avec une très grande rapidité. Trois ampoules d'extrait trypanosomien sont soumises à l'électrophorèse en tampon véronal à pH 8,2 sous 45 mA. Au bout de 2 h 30, l'électrophorèse doit être arrêtée car la fraction est sur le point de disparaître au-delà de la plaque de gélose. La coloration à l'Amido-Schwartz, révèle une très faible teneur en protéines.

Cette observation est confirmée par les récents travaux de VON BRAND (1962, Sao-Paulo) qui met également en évidence une très riche fraction lipidique et un taux plutôt faible d'hydrates de carbone.

Commentaires au sujet du mode opératoire.

La technique employée au cours de cette étude a tout d'abord fait l'objet de nombreuses mises au point, visant à circonscrire l'action des différents facteurs en fonction de l'optimum de la réaction enzymatique.

1° Le milieu nutritif.

Le liquide de Ringer fut tout d'abord utilisé. Milieu trop pauvre, la mortalité cellulaire atteignait 45 % en fin d'expérience.

Le liquide de Tyrode trop alcalin (pH 7,7) ne permettait pas non plus une bonne survie. La mise en liberté de L.D.H., à partir de cellules mortes, représentait une fraction importante d'enzyme, échappant à l'action de l'extrait.

Tamponné à pH 7 par addition de $\text{PO}_4 \text{ H}_2\text{K M/5}$ et enrichi de sérum, à raison de 1 ml pour 10 ml de liquide, il s'avéra maintenir un taux de survie de 80 à 90 %.

A l'addition de sérum, on peut objecter l'apport d'une L.D.H. étrangère. Le lysat de trypanosome n'a pas d'effet lytique direct sur la L.D.H., son mode d'action ne se manifeste que par l'intermédiaire de la cellule cancéreuse vivante. Ce fait a été montré de la façon suivante :

Un sérum est dilué dans la proportion de une partie pour cinq parties d'eau distillée.

Des dilutions log. d'extrait sont réparties dans trois tubes à hémolyse, contenant des quantités égales de sérum dilué. Un 4^e tube constitue le témoin.

La gamme est portée à l'incubation trois heures à 37°.

Le dosage de la L.D.H., est effectué dans chacun des tubes.

Les résultats sont les suivants :

1/100	420 u
1/1.000	420 u
1/10.000	420 u

Une deuxième expérience effectuée dans les mêmes conditions que la précédente, mais ayant pour objet l'étude de la concentration à 10 %, a révélé que cette dernière avait un effet lytique sur la L.D.H. Les résultats suivants sont obtenus :

1/10	600 u
1/100	700 u
1/1.000	700 u
1/10.000	700 u
T	700 u

Il est probable que cet effet toxique observé aux fortes concentrations d'extrait est dû au merthiolate ajouté aux ampoules comme antiseptique, dans la proportion de 0,11 mg. Pour cette raison, il a paru judicieux de ne pas tenir compte de cette concentration lors des évaluations de L.D.H., d'autant plus que l'optimum de l'action enzymatique paraît situé entre 1/1.000 et 1/10.000 d'extrait. Cette dilution n'a pas été testée lors de l'étude de l'inactivation du Trypanosoma.

Cette observation n'a cependant qu'une incidence mineure pour l'ensemble de l'expérimentation et nous verrons ultérieurement que la concentration à 10 % d'extrait trypanosomien, n'a pas d'effet léthal sur les cellules. Tout comme les cellules témoins, elles vivent plusieurs jours et le taux de mortalité inhérent aux conditions artificielles n'est pas plus élevé à leur endroit.

L'objection de l'apport d'une L.D.H. sérique étrangère dans le milieu nutritif, ne doit pas être retenue puisque il est démontré par des chiffres rigoureusement iden-

tiques, que les concentrations moyennes d'extrait, n'ont pas d'effet lytique direct, sur l'enzyme.

L'apport de sérum augmente simplement le taux global de L.D.H. et permet, à partir d'un seuil plus élevé d'enzyme, d'observer les seules fluctuations de la L.D.H. néoplasique.

Ce qu'on cherche à définir se réfère à la mise en évidence d'un phénomène, à l'étude du sens de son évolution en fonction d'un paramètre donné et à son appréciation statistique.

Une détermination en valeur absolue du taux d'enzyme resterait relative, étant fonction de modifications expérimentales : cellules cancéreuses de type différent, concentrations cellulaires variables, en rapport avec un temps d'incubation plus long ou avec des dilutions différentes d'extrait. Mais la variation du phénomène demeurera identique.

2° *Le pH :*

Il doit être maintenu dans une zone très proche de la neutralité.

3° *La température et le temps optimum de contact.*

Il paraît judicieux de placer l'expérience dans des conditions aussi physiologiques que possible. Les résultats les plus constants sont obtenus à 37°, après incubation de 3 heures. Cependant, après 6 heures à 20°, les résultats sont sensiblement les mêmes.

4° *La concentration cellulaire.*

3 millions, 10 millions, 15 millions par ml, constituent des concentrations insuffisantes. A partir de 80 millions, la densité cellulaire entraîne un effet léthal d'anoxie : la L.D.H. libérée à partir des cellules mortes, ne répond

plus à l'action de l'extrait trypanosomien. Un taux de 20 à 50 millions, paraît présenter l'optimum de concentration : survie cellulaire, taux de L.D.H. et s'inscrit dans les possibilités de normalisation métabolique des différentes concentrations d'extraits utilisés.

5° *La L.D.H. trypanosomienne.*

Une expérience préalable avait permis de considérer son apport comme négligeable : 70 unités par ampoule, ce qui pour les concentrations d'extrait utilisées n'entre plus en ligne de compte.

IV. — **Les Courbes Irrégulières.**

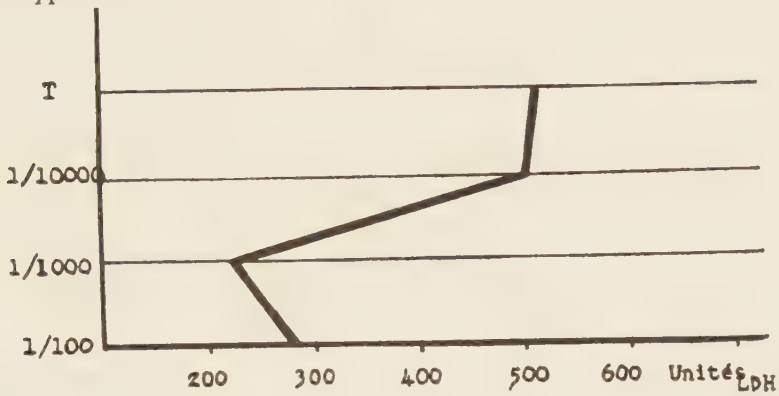
La courbe moyenne paraît a priori ne présenter d'autre difficulté que l'interprétation d'un phénomène enzymatique. Mais au cours des dosages, des irrégularités se sont manifestées avec une certaine fréquence, entre les dilutions à 1/10.000 et le témoin, plus rarement entre 1/1.000 et 1/10.000, parfois entre 1/100 et 1/1.000.

Les courbes prenaient l'aspect suivant (page 47) :

Ces irrégularités étaient assez fréquentes pour discuter une erreur d'expérience. La notation logarithmique laissant une marge très importante entre deux dilutions consécutives, une notation arithmétique devait logiquement amener à préciser ce phénomène.

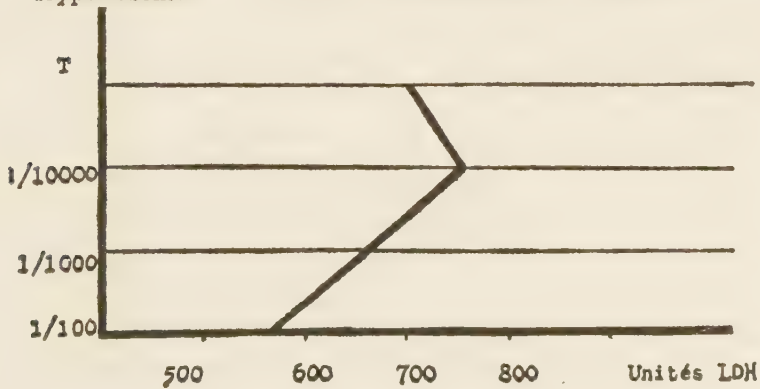
Dilutions Log.
d'extrait de
Trypanosome

DEHYDROGENASE LACTIQUE
Cellules Sarcomateuses d'Ehrlich

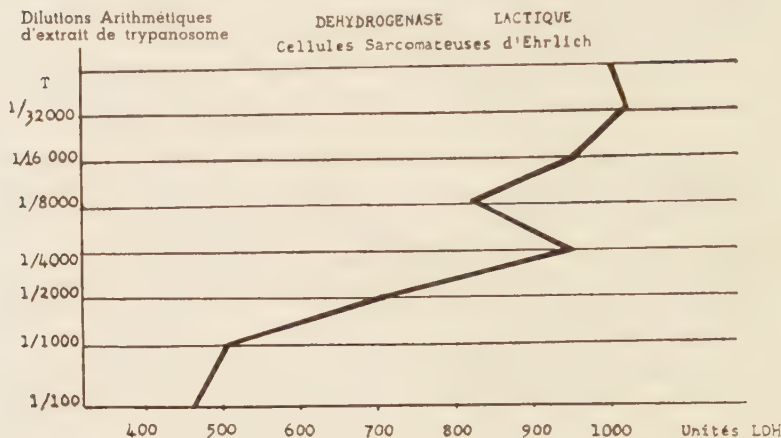


Dilutions Log.
d'extrait de
Trypanosome

DEHYDROGENASE LACTIQUE
Cellules Sarcomateuses d'Ehrlich



La courbe suivante a été obtenue :



Si la conclusion de cette expérience se traduit globalement par une réduction du taux de la L.D.H., proportionnelle à la concentration de l'extrait, la réaction prise dans son détail paraît plus complexe.

Des irrégularités du même type avaient été observées, au cours des travaux sur la réaction de l'indice mitotique, par l'extrait de trypanosome (Laboratoire de Parasitologie, 1960. Pr COUDERT, Mlle M.-R. BATTESTI). Elles avaient été imputées à l'imprécision inhérente à la méthode de mesure du phénomène.

L'interprétation de ces tracés irréguliers soulève diverses hypothèses : cette courbe pourrait être la résultante du jeu de facteurs multiples. De récents travaux américains (1962) en matière d'immunoélectrophorèse définissent deux L.D.H. différentes : la L.D.H. normale et la L.D.H. néoplasique. De structure hétérogène l'une et l'autre, la L.D.H. normale comprend cinq fractions protéiques. La L.D.H. néoplasique est moins complexe, mais concentre

son activité sur la fraction III qui est considérablement augmentée, alors que les autres fractions sont parfois très diminuées.

En fonction de ces données, on peut envisager plusieurs explications à l'irrégularité des tracés :

— si un optimum d'action peut se définir en fonction d'une concentration déterminée d'extrait de trypanosome, sur telle fraction enzymatique de la L.D.H. néoplasique, telle autre fraction peut correspondre à un optimum de concentration différent ;

— il se peut également que la déviation anaérobie de la cellule, ne soit pas toujours complète et entraîne la coexistence d'une L.D.H. néoplasique et d'une L.D.H. normale. Celle-ci échappant à l'action de l'extrait, traduirait une augmentation apparente d'enzyme ;

— d'autre part la structure protéique différente de la L.D.H. néoplasique de la L.D.H. normale, pourrait témoigner en faveur d'une synthèse anormale des protéines, en relation avec une structure particulière des acides nucléiques sarcomateux.

Le système mitochondrial particulièrement riche en R.N.A. et siège de la synthèse enzymatique, produirait alors des structures aberrantes. Nous verrons à propos de l'action sur les acides nucléiques, comment interpréter ces faits.

Dans ces conditions, il est possible que certains aspects des courbes correspondent à la présence d'une L.D.H. normale, nouvellement synthétisée, sur laquelle le lysat de trypanosome n'a pas d'effet.

Inversement, les zones accusant une diminution d'enzyme témoigneraient de la production exagérée d'une L.D.H. néoplasique, sensible à l'action du lysat.

Comme dans la première hypothèse, l'interférence de deux phénomènes serait mise en relief, de même que l'accumulation d'un enzyme, par défaut d'utilisation, serait due à une synthèse protéique viciée. Le problème serait moins complexe, si le lysat de trypanosome, à la manière d'un composé chimique, avait une action lytique directe sur la L.D.H., que traduirait une proportionnalité rigoureuse, entre la concentration et l'abaissement.

Mais si l'on dégage simplement les conclusions globales de l'expérimentation précédente, c'est-à-dire la réduction de la L.D.H., sous l'effet des extraits trypanosomiens et qu'on les rapporte aux résultats obtenus en clinique, on ne peut que remarquer l'analogie des deux phénomènes.

Nous avons calculé statistiquement la valeur de l'écart-type pour les différentes concentrations d'extrait et le témoin sur 10 essais de dosage de la L.D.H. Les résultats suivants sont obtenus :

	SOMMES des valeurs individuelles S (x)	SOMME des carrés des écarts S (X-X) ²	DISPERSION $\frac{S (X-X)^2}{9}$	ECART-TYPE $S = \sqrt{\frac{S (X-X)^2}{9}}$
Témoins de 10 essais	9090 moyenne : 909	634.90	70.454	265
Concentration à $\frac{1}{10.000}$ d'extrait	8760 moyenne : 876	524.640	58.293	241
Concentration à $\frac{1}{1000}$ d'extrait	6940 moyenne : 694	220.390	24.487	156
Concentration à $\frac{1}{100}$ d'extrait	6380 moyenne : 638	178.960	16.884	141

Les Paramètres

X = valeurs individuelles.

S (X) = somme des valeurs individuelles.

$\bar{X}$ = moyenne arithmétique.

S (X-X) = somme des écarts des valeurs par rapport à la moyenne.

S (X-X)² = somme des carrés des écarts.

S² = Dispersion cad :

$$\frac{\text{Somme des carrés des écarts}}{\text{Nombre des valeurs individuelles moins 1}}$$

$$\text{ou } \frac{S (X-X)^2}{N-1}$$

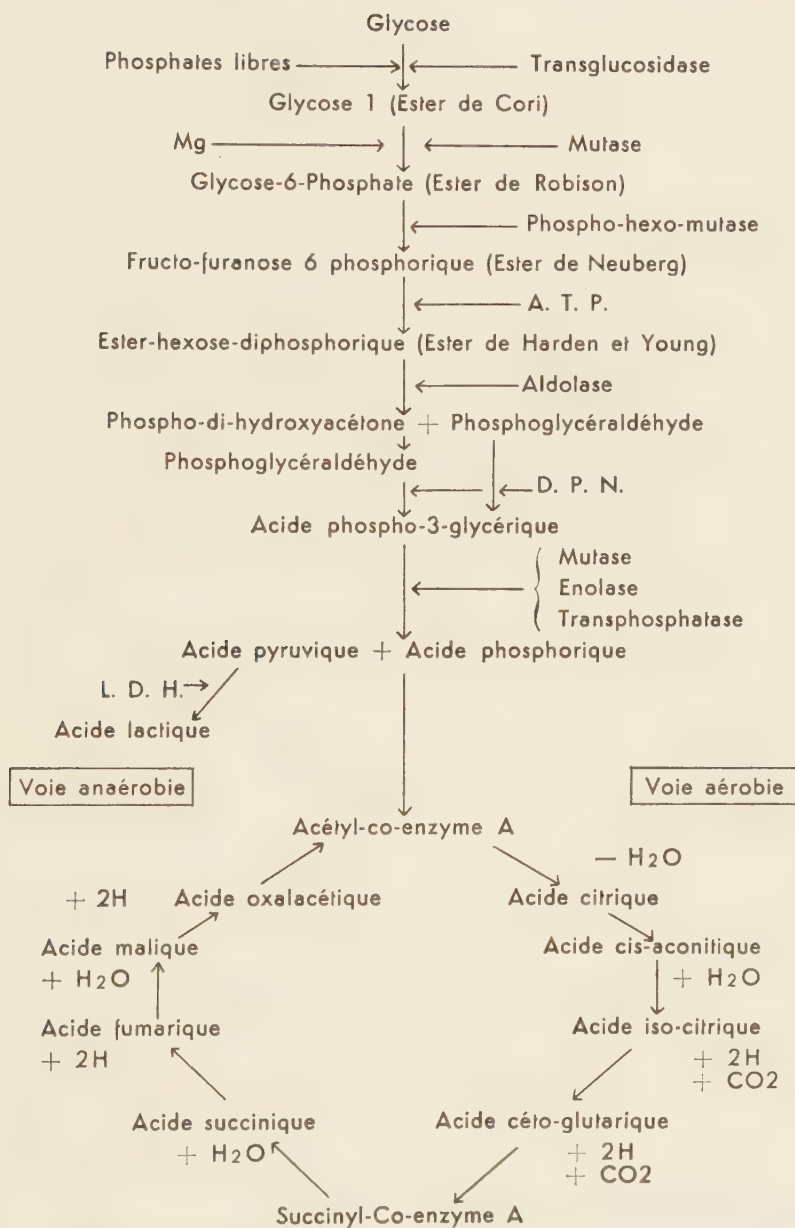
S = Ecart-Tpe = racine carrée de S².

COMMENTAIRES

On remarque une diminution de l'écart-type proportionnelle à la concentration de l'extrait. La diminution de la dispersion paraît objectiver l'intervention d'un facteur de régulation dans la sécrétion de L.D.H.

Par une sorte de planification biologique, un comportement métabolique uniforme tend à s'établir au sein d'une population cellulaire homogénéisée. Inversement, l'écart-type élevé observé dans le témoin et en présence de faibles quantités d'extrait définit une variation liée à l'utilisation, lors des divers essais, de populations cellulaires d'âges variés, en provenance d'animaux différents dont le processus néoplasique peut évoluer différemment.

Il s'ensuit une hétérogénéité métabolique des éléments cellulaires, entraînant une importante variabilité des phénomènes diastasiques. Ainsi l'absence d'unité biologique maintient une valeur élevée de l'écart-type dans la détermination d'un caractère particulier, mais l'évolution générale du phénomène n'en est pas moins significative, les variations extrêmes étant supérieures à l'écart-type.



Le cycle de Krebs en rapport avec le métabolisme glucidique.

LA SUCCINADEHYDROGENASE - LE CYCLE DE KREBS

Les anomalies structurales et métaboliques précédemment observées dans l'étude de la L.D.H. laissaient entrevoir des perturbations dans le déroulement du cycle de Krebs.

Comme il n'est pas possible de discerner, a priori, si tel chaînon plutôt que tel autre, est le siège d'un dérèglement métabolique, l'étape succinique-fumarique a été étudiée à travers le jeu de la succinodéshydrogénase.

Mais il y a lieu tout d'abord d'objectiver à travers le cycle de Krebs, la respiration cellulaire.

Générateur de l'énergie cellulaire par le jeu d'une série de déshydrogenations et de décarboxylations du radical acétyle, le cycle de Krebs, essentiellement aérobie, représente le carrefour vers lequel viennent converger les trois grands métabolismes.

Le radical acétyle représente l'élément final et le terme commun du catabolisme des glucides, des lipides et des protides.

Il se combine au Coenzyme A, par une liaison riche en énergie et constitue l'Acétyl-Coenzyme A.

1. — Les Etapes du Cycle et le Système Cytochrome.

a) LES DIFFÉRENTES ÉTAPES :

1° Condensation de l'*acétyl-coenzyme A* avec l'*acide oxalo-acétique* et formation d'*acide citrique*.

2° *Isomérisation de l'acide citrique en acide iso-citrique*, après déshydratation en un composé intermédiaire, l'acide cis-aconitique et réhydratation. L'ensemble de ces réactions s'effectue sous l'action de l'aconitase.

3° *Déshydrogénation de l'acide isocitrique en acide oxalosuccinique* sous l'effet de l'isocitricodéshydrogénase et de son coenzyme, le D.P.N.

Cette réaction s'accompagne en outre d'une *décarboxylation* et aboutit à l'acide α . *cétoglutarique*.

4° *Décarboxylation oxydative de l'acide α . céto-glutarique* aboutissant au *succinyl-coenzyme A*.

Cette réaction très complexe met en jeu un enzyme l' α . *cétodécarboxylase* et quatre coenzymes :

- le D.P.N. ;
- le pyrophosphate de thiamine ;
- le coenzyme A ;
- l'acide lipoïque.

5° *Formation d'acide succinique* à partir du *succinyl-coenzyme A*.

6° *Déshydrogénation de l'acide succinique en acide fumarique* au moyen de la succinodéshydrogénase et d'un système coenzymatique complexe, associant le F.A.D. aux enzymes transporteurs d'électrons.

La succinodéshydrogénase est en outre solidement liée au système cytochrome. L'ensemble est appelé *succinoxydase*.

7° *Transformation de l'acide fumarique en acide malique* après hydratation.

8° *Déshydrogénation de l'acide malique en acide oxalacétique*, sous l'effet de la malicodéshydrogénase et de son coenzyme le D.P.N.

9° L'acide oxalacétique se condense avec l'acétyl-coenzyme A et le cycle recommence.

Bilan du cycle : dégradation complète du radical acétyle en $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ et reconstitution parallèle de l'A.T.P.

Les réactions précédentes d'oxydo-réduction des substrats par le jeu des enzymes et de leurs coenzymes correspondants, ne peuvent être dissociées des processus de phosphorylation.

La différence de niveau énergétique entre un système substrat-réduit - substrat oxydé et le système coenzymatique qui lui correspond n'est pas dispersée en chaleur, mais elle est récupérée et concrétisée sous la forme d'une énergie biochimique de liaison, résultant du transfert de radicaux « riches en énergie ».

Le jeu des oxydo-réductions phosphorylantes aboutit alors à la formation d'A.T.P., dont la dissociation enzymatique en A.D.P. + P., entraîne un processus d'oxydation cellulaire lui-même facteur de resynthèse de l'A.T.P.

Le cycle de Krebs en dégradant le radical acétyle en $\text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O}$ est en même temps, un générateur d'A.T.P., dont l'utilisation préside à la respiration cellulaire.

Dans un enchaînement aussi minutieux de réactions déshydrogénantes et décarboxylantes, on conçoit les conséquences que pourrait avoir la défaillance de l'un des facteurs enzymatiques ou coenzymatiques. Une anomalie structurale de l'un d'eux résultant d'une protéinogénèse viciée, peut conduire à un dysfonctionnement ou à un blocage du cycle.

Parmi les biocatalyseurs coenzymatiques responsables des réactions chimiques qui se perpétuent au sein de la matière vivante, certains occupent une place primordiale. Mais parmi ceux-ci une discrimination doit être faite.

Le F.A.D. (Flavine-adémine-dinucléotide), par exemple, coenzyme d'un grand nombre de déshydrogénations, aussi bien au niveau du cycle de Krebs que dans les chaînes de transfert d'électrons, n'est pas synthétisé par l'organisme animal. Une déficience éventuelle est alors liée à une carence d'apport riboflavinique.

Il n'en est pas de même du D.P.N., dont le rôle est analogue mais qui intervient en plus dans les oxydo-réductions phosphorylantes. Synthétisé dans l'organisme animal, il est en liaison avec la synthèse des bases pyrimidiques. On conçoit les perturbations profondes qu'est susceptible d'apporter dans la respiration cellulaire un déséquilibre en coenzyme D.P.N. — T.P.N.

b) LE SYSTÈME CYTOCHROME.

Les atomes d'hydrogène issus du cycle de Krebs sont transportés jusqu'à l'oxygène par le jeu du système cytochrome :

— activation de H_2 qui cède son électron au cytochrome b, puis au cytochrome c, puis au cytochrome a, finalement à l'oxygène, les cytochromes passant alternativement de la forme réduite à la forme oxydée.

La libération d'énergie se fait ainsi de façon ménagée et progressive. Le terme final est une molécule d' H_2O_2 , qui sera dissociée en H_2O par une catalase. Le cytochrome c, est réoxydé par la cytochrome-oxydase à laquelle il est lié. Les transferts d'électrons s'accompagnent là aussi d'une phosphorylation qui permet de récupérer sous forme d'A.T.P. la différence énergétique entre deux paliers consécutifs d'oxydo-réduction du cytochrome et du système coenzymatique correspondant : D.P.N. — F.A.D.

2. — La Succinoxydase - Le Chaînon Succinique.

La succinodéhydrogénase est synthétisée par les mitochondries en même temps que les autres enzymes du cycle aérobie. Ces filaments cytoplasmiques riches en R.N.A. élaborent un nombre important d'enzymes et sont également le lieu de l'oxydoréduction phosphorylante, génératrice de l'énergie cellulaire.

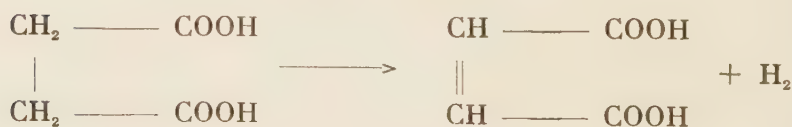
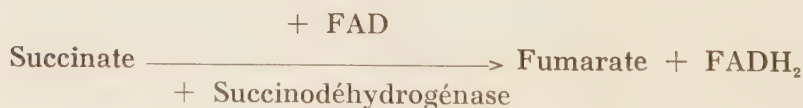
La succinodéhydrogénase qui oxyde l'acide succinique en acide fumarique présente la particularité d'être très solidement attachée à son coenzyme le F.A.D., lui-même lié et difficilement dissociable du système cytochrome-cytochromoxydase. L'ensemble, qui comporte encore d'autres facteurs accessoires, est appelé succinoxydase.

On conçoit, dans ces conditions, les difficultés que présente le dosage de la succinodéhydrogénase.

LA TECHNIQUE DE DOSAGE DE LA SUCCINODEHYDROGENASE

1° PRINCIPE.

La spécificité de la succinodéhydrogénase s'inscrit dans l'équation :



Des auteurs américains ont établi que le méthosulfate de Phénazine (P.M.S.) peut se comporter comme un transporteur d'électrons entre le système succinodéhydrogénase et l'oxygène moléculaire : l'hydrogène libéré par le jeu réciproque de la déhydrogénase et de son coenzyme le F.A.D., est capté par le méthosulfate de phénazine.

Si, à l'oxygène moléculaire on substitue un composé iodé, le chlorure de p. iodophényl — p. nitrophényl — phényltétrazolium (I.N.T.) celui-ci se trouve réduit et le composé formé se prête à une évaluation colorimétrique.

Sa réduction plus ou moins importante se manifestant par une densité optique plus ou moins élevée donne une mesure de l'activité de la succinodéhydrogénase.

Cette méthode a permis de mettre en évidence l'abaissement de l'enzyme succinique dans le surnageant d'une suspension de cellules carcinomateuses mis au contact d'extrait trypanosomien.

2° LES FACTEURS EN PRÉSENCE.

— *Suspension de cellules carcinomateuses* à 40 millions de cellules par ml dans le liquide de Tyrode additionné de sérum et tamponné à pH 7.

— *L'extrait de trypanosome* : une ampoule d'extrait filtré et lyophilisé est dissoute dans deux ml de liquide de Tyrode modifié. Cette ampoule constitue la solution-mère à partir de laquelle sera faite la 1^{re} dilution.

— *Les réactifs.*

Succinate Na	0,2 M	
Tampon phosphate	0,1 M	pH 7,7
Gélatine	0,1 %	
I.N.T.	0,2 %	
P.M.S.	0,8 %	
HCl	0,25 M	

Le succinate de soude 0,2 M constitue le substrat à partir duquel sera transféré l'hydrogène. Son oxydation en fumarate, mise en évidence par la réduction de l'I.N.T., témoigne de la spécificité de la réaction enzymatique.

La gélatine permet de maintenir l'I.N.T. réduit dans un état de dispersion qui facilite son évaluation spectrophotométrique. La solution de gélatine à 0,1 % est préparée extemporanément à partir d'une solution stock à 5 %, dans l'eau distillée.

La solution d'I.N.T. à 0,2 % dans l'eau distillée est conservée à + 5°.

La solution de P.M.S. à 0,8 % dans l'eau distillée doit être conservée dans une bouteille brune, à + 5°, car le P.M.S., par suite d'un phénomène photochimique, donne lieu en présence de lumière vive à une fluorescence verte.

HCl à 0,25 M est ajouté à chacun des tubes en fin d'opération afin d'arrêter la réaction enzymatique.

3° LE MODE OPÉRATOIRE.

a) Quatre tubes à hémolyse stériles contenant des quantités égales de suspension cellulaire sont additionnés de dilutions décimales d'extrait trypanosomien.

1/10 1/100 1/1.000 1/10.000

Un 5° tube constitue le témoin

La gamme est portée à l'incubation à 37° pendant 3 heures. La quantité totale de liquide a été amenée à 3 ml.

b) Une 2° gamme est constituée avec 5 tubes à colorimétrie. Les quantités suivantes de réactifs sont ajoutées à chacun d'eux :

Succinate Na 0,2 M	0 ml 5
Tampon phosphate 0,1 M, pH 7	1 ml 5
Gélatine 0,1 %	0 ml 5
I.N.T. 0,2 %	1 ml

Incubation : 30 minutes à 37°.

c) La 1^{re} gamme contenant la suspension cellulaire et l'extrait de Trypanosome est centrifugée à 3.000 tours pendant 3 minutes.

— 0,5 ml de liquide surnageant de chacun des tubes de cette gamme est porté dans le tube homologue de la deuxième gamme.

— 0,5 ml de P.M.S. à 0,8 % sont ajoutés dans chaque tube.

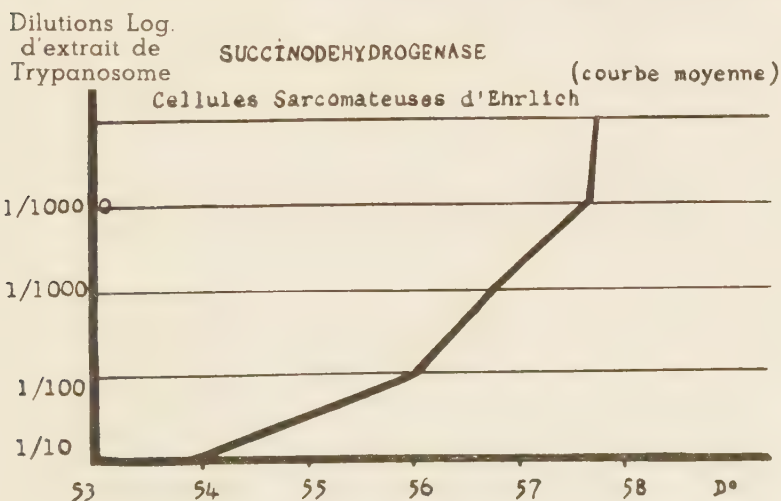
— Incubation 15 minutes à 37°C.

— Arrêt de la réaction enzymatique par addition dans chacun des tubes de 0,5 ml de ClH à 0,25 M qui amène le pH à 6.

— Lecture des D° entre 30 et 60 minutes sous 5.400 Å en protégeant les tubes de la lumière vive.

4° LES RÉSULTATS. LA COURBE MOYENNE DE SEPT EXPÉRIENCES.

On remarque une forte réduction de l'I.N.T. dans le tube témoin, se manifestant par une coloration beige foncé. Dans les autres tubes, des taux de réduction plus faibles



mettent en évidence l'abaissement de la succinodéhydrogénase, constant et proportionnel à la concentration de l'extrait de trypanosome. Le phénomène s'inscrit selon une relation de type linéaire.

La courbe moyenne des sept expériences exprime cette relation. Les densités optiques sont portées en abscisse, les concentrations d'extrait en ordonnées.

DISCUSSION DE LA RÉACTION.

a) La concentration cellulaire : 40 millions de cellules par ml, s'avèrent nécessaires. Une concentration plus faible (25 millions par ml) conduit à des résultats irréguliers ou difficilement interprétables.

b) Les témoins : plusieurs témoins sont constitués afin de garantir la spécificité de la réaction.

Témoins réactif.

H ₂ O distillée	0 ml 5
(à la place du succinate de Na)	
Tampon phosphate 0,1 M	1 ml 5
Gélatine 0,1 %	0 ml 5
I.N.T. 0,2 %	1 ml

Incubation 30 minutes à 37°.

addition de :

+ 0 ml 5 d'eau distillée (à la place de la suspension cellulaire).

+ 0 ml 5 P.M.S. 8 %.
cellulaire).

Incubation 15 minutes à 37°.

On ne remarque aucune réduction de l'I.N.T. La coloration jaune évolue lentement au vert fluorescent.

Témoin réactif + Succinate Na.

Succinate Na 0,2 M	0 ml 5
Tampon phosphate 0,1 M	1 ml 5
Gélatine 0,1 %	0 ml 5
I.N.T. 0,2 %	1 ml

Incubation 30 minutes à 37°.

addition de :

+ 0 ml 5 d'eau distillée (à la place de la suspension

+ 0 ml 5 P.M.S. 8 %.

Incubation 15 minutes à 37°.

Aucune réduction. La coloration jaune évolue peu à peu au vert fluorescent.

Témoin liquide de Tyrode modifié.

Eau distillée	0 ml 5
Tampon phosphate 0,1 M	1 ml 5
Gélatine 0,1 %	0 ml 5
I.N.T. 0,2 %	1 ml

Incubation 30 minutes à 37°.

addition de :

+ 0 ml 5 liquide de Tyrode modifié.

+ 0 ml 5 P.M.S. 0,8 %.

Incubation 15 minutes à 37°.

Aucune réduction. La coloration jaune évolue peu à peu au vert fluorescent.

Témoin extrait de Trypanosome.

Succinate Na 0,2 M	0 ml 5
Tampon phosphate 0,1 M	1 ml 5
Gélatine 0,1 %	0 ml 5
I.N.T. 0,2 %	1 ml

Incubation 30 minutes à 37°.

addition de :

+ 0 ml 5 P.M.S. 0,8 %.

+ 1 ml d'extrait de trypanosome en solution-mère dans le liquide de Tyrode modifié, soit une dose beaucoup plus élevée que celle utilisée dans la gamme en cours d'expérience.

En prolongeant le temps d'incubation à 37°, jusqu'à une heure, on note une légère réduction de l'I.N.T. Ceci ne saurait surprendre si l'on considère que la complexité biologique de l'extrait de trypanosome est en rapport avec une très grande richesse en enzymes. Mais cette réduction apparaît pour une concentration d'extrait et au bout d'un temps sans rapport avec la mise en évidence du phénomène que l'on étudie, et ne paraît pas devoir être retenue.

5° LA CONCLUSION.

La courbe obtenue est du même type que celle se référant à la L.D.H. Ces analogies sont surprenantes et l'hypothèse d'une accumulation par défaut d'utilisation, conséquence d'une anomalie structurale, due à une enzymogénèse viciée, peut, là aussi, être envisagée.

Les auteurs soviétiques expérimentant sur un homogénéisat de sarcome de Crocker, avaient également conclu à la réduction de la succinodéhydrogénase, sous l'influence des extraits trypanosomiens. De plus, ils avaient montré que l'abaissement de cette enzyme, s'accompagnait d'une augmentation de la cytochrome oxydase : cela paraît dans la logique des faits. La non-utilisation ou l'utilisation partielle d'une étape déshydrogénante prive le système cytochrome de l'énergie nécessaire à son fonctionnement et rend alors inutile le jeu des enzymes correspondants : d'où un abaissement de la cytochromoxydase. Que l'étape suc-

cinique-fumarique se normalise ; que le transfert d'électrons ait lieu à nouveau vers le cytochrome b et l'ensemble du système retrouvera (à travers le jeu normal de chacun de ses enzymes) la restauration du métabolisme aérobie.

L'ACIDE PYRUVIQUE - L'ACIDE LACTIQUE

1. — L'Acide Pyruvique.

L'acide pyruvique, dernier terme des processus de phosphorylation du glucose, mais aussi étape importante dont la décarboxylation et l'acétylation marquent l'ouverture du cycle aérobie, a paru devoir apporter des précisions utiles à la compréhension du métabolisme tumoral.

Les anomalies structurales et métaboliques précédemment observées, dans l'étude de la L.D.H. et l'expérimentation précédente indiquant un blocage dans le cycle de Krebs, nous avons évalué les variations de l'acide pyruvique libéré dans le milieu de survie des cellules sarcomateuses.

L'acide pyruvique présente une importance particulière au carrefour du métabolisme des glucides et des protides : dernier échelon des processus de phosphorylation du glucose, il est en même temps le terme final d'une étape de transamination. Mais surtout dépendra de lui le devenir biologique de la cellule, car il constitue un élément charnière. En aérobose, sa décarboxylation oxydative conduit à l'acétyl coenzyme A, qui ouvre le cycle de Krebs. En anaérobiose, il se transforme en acide lactique, c'est la glycolyse anaérobie.

En raison des perturbations rencontrées dans le mécanisme de la glycolyse aérobie, son comportement a été étudié uniquement en tant que chaînon du métabolisme des hydrates de carbone.

Le glycogène qui constitue la réserve glucidique est dégradé dans les tissus jusqu'à l'acide pyruvique, selon

un processus complexe, mettant en jeu une cascade d'oxydo-réductions phosphorylantes : le schéma d'Embden-Meyerhof.

La voie d'Embden-Meyerhof. On peut schématiser les étapes de la façon suivante : A partir du glucose, formation successive de :

1° *Glucose 1 — Phosphate ou ester de Cori.*

— réaction catalysée par une transglucosidase et mettant en jeu les phosphates libres.

2° *Isomérisation en glucose 6 phosphate ou ester de Robinson.*

— sous l'effet d'une mutase et en présence d'ions Mg.

3° *Isomérisation en ester fructofuranose 6 phosphorique ou ester de Neuberg.*

— avec transformation du cycle pyranique en cycle furanique sous l'effet d'une phosphohexomutase.

4° Phosphorylation en ester fructofuranose 6 phosphorique ou *ester de Harden et Young* avec intervention de l'acide phosphorique sous forme d'A.T.P. et non plus de phosphates libres.

5° *Scission du chaînon précédent* en phosphodihydroxyacétone et *phosphoglycéraldéhyde* suivi d'une transformation progressive du premier terme dans le second.

6° *Oxydation du phosphoglycéraldéhyde en acide phosphoglycérique.*

— réaction d'oxydo-réduction phosphorylante génératrice d'A.T.P.

7° Transformation de l'*acide phosphoglycérique en acide pyruvique* avec libération de $\text{PO}_4 \text{H}_3$.

L'étude de l'acide pyruvique rapporté à la cellule sarcomateuse laissait supposer certaines fluctuations en liaison

avec une déviation plus ou moins profonde vers l'anaérobiose. L'expérimentation suivante a mis en évidence une réduction du taux de l'acide pyruvique, libérée dans le milieu nutritif d'une suspension de cellules sarcomateuses, additionnées d'extrait trypanosomien.

La détection et l'évaluation de l'acide pyruvique s'effectue par la réaction colorée qu'il donne en présence de dinitrophénylhydrazine en milieu alcalin*.

TECHNIQUE.

1° *Préparation de la suspension cellulaire* dans le liquide de Tyrode modifié. *Préparation des dilutions d'extrait.*

Dans quatre tubes à essai stériles, contenant des quantités égales de suspension cellulaire à 40 millions de cellules par ml, on établit comme pour les expériences précédentes, la gamme des dilutions log. d'extrait : 1/10 1/100 1/1.000 1/10.000. Un cinquième tube constitue le témoin.

La quantité totale de liquide est amenée dans chaque tube à 12 ml, car la réaction doit s'effectuer sur 10 ml de surnageant. Les tubes sont portés 3 heures à l'incubation à 37°.

2° *Les Réactifs en présence.*

- Solution de 2.4. dinitrophénylhydrazine dans ClH.
- Acétate d'éthyle.
- Solution de $\text{CO}_3 \text{Na}_2$ à 10 % dans H_2O .
- NaOH/N.

* La technique de dosage a été communiquée par les Laboratoire du Cytochrome (ROBILLARD).

3° La Réaction elle-même.

- Extraction de l'acide pyruvique par l'acétate d'éthyle.
- Caractérisation en phénylhydrazone.
- Evaluation spectrophotométrique.

Les cinq tubes sont centrifugés trois minutes à 3.000 tours/minutes. *Chacun des 5 surnageants est repris et traité de la façon suivante :*

- dans un tube à essai mettre 10 ml de surnageant + 4 ml de sol. dinitrophénylhydrazine.
- Mélanger. Abandonner 10 minutes.
- Ajouter 5 ml d'acétate d'éthyle.
- Agiter énergiquement trois minutes. Centrifuger.
- Décanter la phase aqueuse dans un autre tube et réextraire par 3 ml d'acétate d'éthyle. Joindre ces derniers aux 5 ml précédents. Ces 8 ml d'acétate d'éthyle sont repris à leur tour deux fois de suite avec 4 ml de solution de CO_3Na_2 à 10 %.

Les couches carbonatées sont lavées avec un 1 ml d'acétate d'éthyle. Mettre ensuite dans deux tubes à colorimétriser :

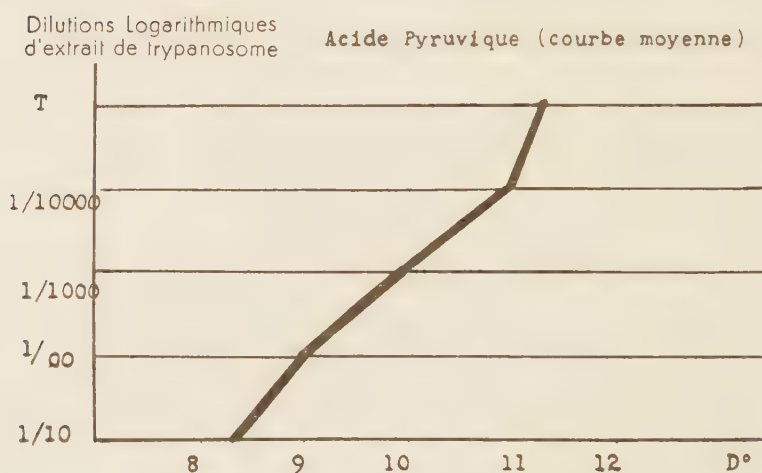
I) Solution carbonatée	2 ml
eau distillée	2 ml
II) Solution carbonatée	2 ml
NaOH/N	2 ml

L'addition de NaOH/N fait apparaître une coloration marron clair. Lire la D° au spectrophotomètre après avoir réglé le zéro avec la solution I. La longueur d'onde optimale se trouve à 4.300 Å. La lecture doit être faite dans les 15 minutes qui suivent la réaction. Ensuite, la coloration s'estompe.

4° Les résultats.

Comme lors des évaluations d'enzymes glycolytiques, on observe une réduction du taux de l'acide pyruvique, proportionnelle à la concentration de l'extrait.

Courbe moyenne de six expériences :



5° Conclusions.

L'abaissement du taux d'acide pyruvique laisse supposer le retour au jeu normal du système enzymatique présidant à sa décarboxylation et à son acétylation : deux réactions fondamentales qui marquent l'ouverture du cycle aérobie.

Doit-on en déduire qu'au sein de la cellule sarcomateuse la décarboxylation oxydative s'effectue imparfaitement et que l'acide pyruvique s'accumule ? Cette réaction a priori très simple met en jeu un mécanisme particulièrement complexe, procédant en plusieurs étapes consécutives dans lesquelles interviennent différents facteurs :

1 apo-enzyme spécifique.

4 coenzymes :

- la thiamine pyrophosphate.
- l'acide lipoïdique porteur d'un groupe S-S.
- le D.P.N.
- le coenzyme A, lui-même formé d'acide panthoténique, d'adénine, de ribose, de PO_4H_3 .
- l'ion magnésium.

L'insuffisance de l'un de ces facteurs peut être liée pour certains d'entre eux à une synthèse protéique imparfaite.

Il se peut également que les voies de la glycolyse, à la suite d'un dysfonctionnement enzymatique dans les oxydo-réductions phosphorylantes aboutissent à un excès d'acide pyruvique.

On ne peut manquer de rapprocher de cette observation le fait que les états cancéreux avancés s'accompagnent d'une augmentation des glycoprotéines sériques : hexosamine, acide sialique, fucose et surtout de l'haptoglobine.

Les cas d'obstruction maligne des canaux biliaires et les métastases hépatiques de néoplasmes sont associées à une augmentation de l'acide pyruvique sérique. La Transaminase-Glutamique-Pyruvique et les liquides d'ascites cancéreuses, sont caractérisées par une haute teneur en α_1 et α_2 glycoprotéines.

Ces observations cliniques jointes aux conclusions de l'expérience précédente mettent en relief de singulières analogies.

2. — L'Acide Lactique.

On ne peut dissocier au sein de la biologie cellulaire, le métabolisme de l'acide pyruvique de celui de l'acide lactique.

Ils représentent les deux pôles d'une réaction réversible, catalysée par la déshydrogénase lactique en présence de son coenzyme, le D.P.P.N.

L'abaissement du taux d'acide pyruvique sous l'influence de l'extrait de trypanosome dans le milieu nutritif d'une suspension de cellules sarcomateuses, incitait à rechercher les fluctuations de l'acide lactique, en fonction du même facteur.

Le mode opératoire.

Les conditions expérimentales suivantes ont été observées :

— on utilise une suspension de cellules sarcomateuses à 40 millions de cellules par ml. dans le liquide Tyrode modifié.

— dans 4 tubes à hémolyses stériles, contenant des quantités égales de suspension cellulaire, sont effectuées les dilutions log. d'extrait trypanosomien :

— 1/10 1/100 1/1.000 1/10.000

— Un 5^e tube constitue le témoin.

— Incubation 3 heures à 37°.

— Centrifugation 3 minutes à 3.000 tours/minutes.

— Examen du surnageant dans les 5 tubes.

Caractérisation de l'acide lactique au niveau du tube témoin.

a) *par la formation d'iodoforme.*

2 ml de surnageant

+ 0 ml 5 de solution iodo-iodurée à 12 %

+ quelques ml de lessive de soude.

On obtient un précipité d'iodoforme, spécifique de l'acide lactique.

b) *par la réaction d'Uffelmann.*

2 ml de surnageant

+ 2 ml de réactif d'Uffelmann.

Le réactif violet améthyste vire au jaune. C'est une réaction des acides alcool.

c) *par la réaction de Berg.*

2 ml de surnageant

+ 2 ml de réactif de Berg.

On obtient une coloration jaune. C'est également une réaction des acides-alcools.

2° Etude des fluctuations de l'acide lactique libéré par les cellules sarcomateuses en présence de lysat de Trypanosome.

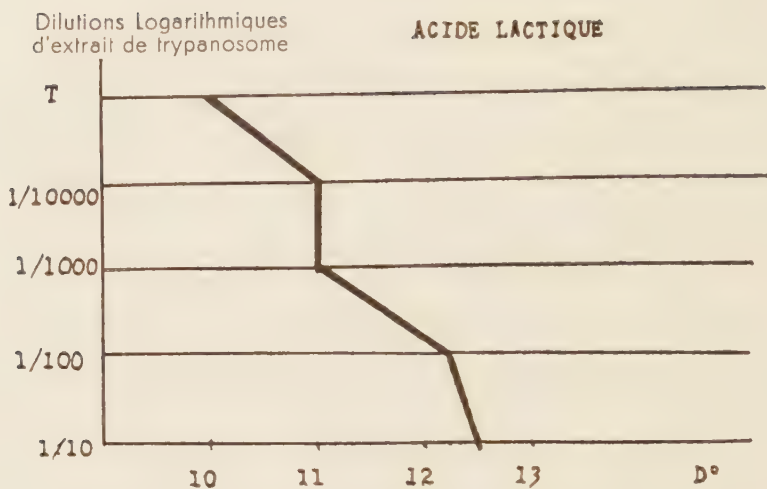
— Nous avons utilisé la réaction de Berg qui se prête à une évaluation spectrophotométrique.

Le liquide surnageant de chacun des 5 tubes de la gamme en cours d'étude est additionné de réactif de Berg :

2 ml de surnageant

+ 2 ml de réactif de Berg.

La coloration jaune obtenue présente un maximum d'absorption à 4.800 $\overline{\text{A}}$. Les différentes densités optiques des 5 liquides surnageants mettent en évidence un accroissement du taux d'acide lactique proportionnel à la concentration de l'extrait. Les expériences qui ont été effectuées dans les conditions précédentes ont permis d'établir la courbe suivante :



Cette évaluation photométrique appelle une détermination plus précise, non pas dans le but d'apporter à une expérience toute relative une valeur absolue, mais pour confirmer les résultats précédents.

Cette technique est communiquée par la firme Biochemica Boehringer de Mannheim.

Principe de la méthode :

La réaction suivante est catalysée par la L.D.H. :



L'équilibre de la réaction se trouve du côté Lactate-D.P.N., mais il peut être orienté du côté Pyruvate-D.P.N.H. par addition d'un excès de D.P.N. en milieu alcalin et transformation en hydrazone du Pyruvate formé dans la réaction par addition d'hydrazine.

Ces conditions amènent une conversion quantitative du lactate en Pyruvate et entraînent une réduction du D.P.N. en D.P.N.H. selon un rapport déterminé.

Le D.P.N.H. ainsi formé est mesuré par voie photométrique à la longueur d'onde de $3.400 \text{ \AA}$ qui correspond

au maximum d'absorption du D.P.N.H. Compte tenu du coefficient d'extinction du D.P.N.H., on calcule la teneur en acide lactique de l'échantillon examiné.

Les réactifs.

1° *Tampon glycérimé pH 9* Glycérine
 Hydrazine

La solution est effectuée dans le flacon n° 1 et amenée à 50 ml avec de l'eau distillée.

2° *Diphosphopyridine nucléotide (D.P.N.).*

100 mg de D.P.N. contenus dans le flacon n° 2 sont intégralement dissous dans 5 ml d'eau bi-distillée. La solution s'effectue dans le flacon même.

3° *La L.D.H.*

La suspension contenue dans le flacon n° 3 est utilisée sans dilution (2 mg d'enzyme par ml).

Cette méthode est appliquée au dosage de l'acide lactique dans le sang ou le sérum. Dans ce cas, il y a lieu de déprotéiniser préalablement à l'acide perchlorique. Mais dans l'expérience présente, la quantité extrêmement faible de protéines se trouvant dans le surnageant ne paraît pas devoir amener des perturbations dans le dosage.

Mode opératoire :

Pipetter dans un tube test les réactifs suivants :

- 2 ml de solution Tampon glycérimé + hydrazine.
- 0,10 ml de surnageant.
- 0,03 ml L.D.H.
- 0,20 ml D.P.N.

Bien mélanger par agitation modérée et maintenir au bain-marie à 25°C pendant 1 h.

Lire l'absorption à 3.400 A en tenant compte du coefficient d'extinction du D.P.N.H., et en présence d'un témoin à blanc.

Les résultats obtenus :

Les surnageants des 5 tubes contenant les suspensions cellulaires additionnées d'extrait trypanosomien contiennent les quantités suivantes d'acide lactique :

Tube contenant

1			
—	d'extrait trypanosomien	2 mg,	662 de lactate %
10			
1			
—	»	»	2 mg, 271 %
100			
1			
—	»	»	2 mg, 187 %
1000			
1			
—	»	»	2 mg, 171 %
10.000			
Tube Témoin		2 mg,	140 %

Cette évaluation quantitative confirme les résultats obtenus précédemment avec la méthode spectrophotométrique : on observe donc un accroissement du taux d'acide lactique proportionnel à la concentration d'extrait trypanosomien.

A priori, il paraît logique de constater une évolution inverse du taux des acides lactiques et pyruviques, mais compte tenu des fluctuations de la L.D.H., le jeu réciproque de ces trois facteurs soulève un problème complexe.

Les différents réactifs dont il vient d'être fait mention sont contenus dans la trousse Biochemica Test Boehringer, Milchsaure Test : Enzymatische Bestimmung der L. Lactat Konzentration im Blut oder Serum).

Si l'on considère que le blocage du cycle de Krebs, au niveau du chaînon pyruvique est la conséquence de la non-utilisation d'un coenzyme défectueux, devant assurer la décarboxylation-oxydative ; que d'autre part au sein

de la cellule sarcomateuse existe un taux élevé de L.D.H. pathologique également non utilisable, et sans doute aussi une faible quantité de la L.D.H. normale, on pourrait essayer de comprendre les faits de la façon suivante :

— La L.D.H. normale restante afin d'assurer la survie cellulaire, instaure un processus d'anaérobiose.

— Sous l'action de l'extrait de trypanosome, la L.D.H. pathologique qui se trouve alors utilisée est abaissée en même temps que la fraction excédente d'acide pyruvique. Celle-ci est transformée en acide lactique : c'est le phénomène de déblocage que l'on observe.

L'ensemble de ces phénomènes pourrait correspondre à la 1^{re} phase de métabolisation. L'acide pyruvique ramené à son taux normal serait alors pris en charge par les enzymes normalisés de la décarboxylation oxydative et rentrerait dans le cycle de Krebs. Ainsi serait restaurée l'aérobiose. Ce serait la seconde phase de métabolisation.

Ce ne sont évidemment là que des hypothèses et le problème demeure en suspens. Il faut donc admettre la complexité de cette question, en rapport avec les interférences des deux processus glycolytiques qui s'affrontent au niveau de la cellule cancéreuse. On retrouve ici les conclusions de WARBURG.

Cependant, l'anaérobiose domine. Cette variation semblerait plutôt se rattacher à une perturbation biologique essentielle, liée à une altération de la protéinogèse, alors que les processus d'anaérobiose des syndromes anoxémiques traduiraient un trouble primitif.



Les perturbations fondamentales qui ont été observées au cours des recherches précédentes ont amené à la conclusion que leur origine ne pouvait se situer qu'à un plan supérieur du métabolisme cellulaire, au niveau de la synthèse enzymatique dont les acides nucléiques sont les organisateurs.

III^e PARTIE

LES ACIDES NUCLEIQUES

INTERET GENERAL DES ACIDES NUCLEIQUES

Nous rappellerons brièvement la structure des acides nucléiques.

L'acide désoxyribonucléique (D.N.A.)

Polynucléotide d'un P.M. très élevé, localisé au niveau du noyau, support des gènes et des caractères héréditaires, le D.N.A. présente une architecture moléculaire d'un type très spécial confirmée par la microscopie électronique et la diffraction des rayons X (WATSON-CRICK).

Deux rubans parallèles représentant deux chaînes, acide phosphorique - désoxyribose sont enroulées en une double spirale, autour d'un axe central. A la façon des marches d'un escalier, les bases puriques et pyrimidiques relient les deux rubans et sont associées en des paires toujours identiques :

Adénine ———— Thymine
Cytosine ———— Guanine

une base purique s'attachant à une base pyrimidique.

La séquence des bases dans une chaîne conditionne automatiquement celle de l'autre chaîne, mais deux molécules de D.N.A., peuvent être différentes, car non seule-

ment la séquence de leurs bases peut être variable le long de la chaîne polynucléotique, mais aussi les proportions de ces bases.

Au sein d'un nucléotide, le rapport moléculaire Py/Pu est toujours égal à 1, mais au niveau de la molécule de D.N.A., les rapports :

Adénine	————	Thymine
Cytosine	————	Guanine

sont variables et caractéristiques d'une espèce déterminée. En ce sens, on peut parler d'une hétérogénéité du D.N.A.

Les nucléotides sont unis entre eux par des liaisons phosphodiester entre le C3 et le C5 de deux désoxyriboses consécutifs.

L'énorme molécule polynucléotique est associée à des protamines et à des histones. L'ensemble atteint un P.M. de plusieurs millions.

L'acide ribonucléique (R.N.A.)

C'est également un polynucléotide constitué par l'union d'un très grand nombre de chaînes. A côté du ribose et de l'acide phosphorique, il comprend quatre bases azotées puriques et pyrimidiques, l'adénine, la cytosine, la guanine et l'uracile.

Il se localise dans le cytoplasme au niveau des microsomes et des mitochondries, dans le noyau, à l'endroit du nucléole.

La séquence et la proportion des bases peut être différente le long d'une chaîne. D'où l'immense variété des polynucléotides qui démontrent l'hétérogénéité du R.N.A.

Une liaison phosphodiester entre le C3 et le C5 de deux molécules de ribose consécutives relie entre eux les

nucléotides. Ceci a pu être objectivé après hydrolyse par la ribonucléase (Travaux de MARKAM-JACKSON).

Les protéines associées à la molécule de R.N.A. sont moins basiques que les histones. L'ensemble atteint un P.M. très élevé de 10.000 à 250.000, variable d'un constituant cellulaire à l'autre.

La synthèse protéique.

Axée sur ces deux entités biochimiques que sont le D.N.A. et le R.N.A., va s'organiser la vie de la cellule, en commençant par l'édification du substratum nécessaire à toutes les interférences biologiques: la synthèse protéique.

Le D.N.A., responsable des potentialités génétiques de la cellule, est le promoteur de la protéinogénèse qu'il dirige par l'intermédiaire du R.N.A., qui en sera l'effecteur. Le premier temps de la synthèse protéique est celui de l'activation des acides aminés. Il correspond à une étape de transfert d'énergie à partir de l'A.T.P. sur l'acide aminé, en présence d'un enzyme activateur. On obtient ainsi un adénylate d'acide aminé porteur d'une liaison « active » et qui reste solidement attaché à son enzyme.

L'ensemble est transféré sur un polyribonucléotide dissous dans le suc cellulaire. C'est le R.N.A. soluble qui joue un rôle d'adaptateur. On l'appelle encore R.N.A. de transfert.

Ces oligonucléotides adaptateurs, porteurs de leur acide aminé, se fixent sur la matrice ribonucléique microsomiale. L'union s'effectue par l'intermédiaire d'une liaison hydrogène entre les bases réciproques en présence.

Les moules ou matrices ribonucléiques sont formées dans le noyau au contact du D.N.A. Ils sont les messagers du D.N.A. dont ils copient la composition chimique et sont transportés sur les lieux de la protéinogénèse.

On conçoit qu'une mutation du D.N.A. entraîne une altération du moule ribonucléique microsomial s'étendant à la protéine qui doit prendre naissance. Les acides aminés ainsi alignés sur le moule ribonucléique, sont prêts à se combiner entre eux selon un enchaînement déterminé, qui aboutira à l'élaboration de la protéine spécifique. La théorie du triplet a permis de comprendre comment la structure du R.N.A. peut permettre la détermination de celle des protéines.

Le R.N.A. étant formé de quatre types nucléotidiques que l'on désigne par les abréviations : A.G.U.C., les protéines étant constituées par vingt acides aminés, la difficulté consistait à définir par quel mécanisme la place spécifique de chacun d'eux, pouvait être fixée par un nombre de nucléotides mathématiquement insuffisant.

Les travaux de CRICK, NIREMBERG, SPIEGELMANN ont conduit à la notion qu'un ensemble de trois unités nucléotidiques était nécessaire pour « coder » les acides aminés. On aura par exemple les correspondances suivantes :

U.G.U. = Valine	}	On conçoit qu'une mutation au niveau du triplet U.G.C. en U.G.A., substitue la glu- tamine à la glycine.
C.C.C. = Proline		
U.G.C. = Glycine		
U.G.A. = Glutamine		

Ainsi, dans l'anémie falciforme, l'hémoglobine S, diffère de l'hémoglobine normale, par le remplacement dans la chaîne polypeptique de la globine d'un acide glutamique par une valine.

Nous avons vu qu'une L.D.H. néoplasique a été mise en évidence et définie par un groupe de chercheurs américains, comme possédant une structure protéique différente de l'enzyme normal : une altération du patrimoine héréditaire peut être à l'origine d'une protéinogenèse définitivement faussée.

Au niveau de la cellule cancéreuse, il semble bien que l'acquisition de caractères permanents, stables et transmissibles, soit due à une modification de l'appareil génétique.

Par ailleurs, il a été démontré (DAVIDSON), que les cellules néoplasiques se caractérisent par une teneur particulièrement élevée en acides nucléiques.

Influence de l'extrait de Trypanosome sur les acides nucléiques sarcomateux.

En 1960, des travaux ont été effectués au laboratoire de Parasitologie sur des cellules néoplasiques de culture de la souche K. B. (Pr COUDERT - Mlle Dr BATTISTI).

Ces cellules qui présentent normalement une proportion de 6 à 10 % d'éléments en mitose furent mises au contact de l'extrait filtré et lyophilisé de Trypanosome. L'addition de celui-ci entraînait une réduction de l'index mitotique. La courbe objectivant le phénomène en fonction des concentrations de lysat de Trypanosome, est superposable à celles obtenues lors des évaluations d'enzyme succinique et lactique des cellules sarcomateuses d'Ehrlich.

Conclusion identique : La réduction de l'indice mitotique est constante et proportionnelle à la concentration de l'extrait.

Cette observation présente en plus un intérêt théorique fondamental : Elle permet d'atteindre à un plan supérieur de la biologie cellulaire, en démontrant l'action de l'extrait de Trypanosome sur le noyau. Elle souligne ce fait important : la proportion considérable de figures mitotiques observées dans la population cellulaire, n'est qu'une apparence d'activité accrue de division.

Ce sont là des cellules bloquées au niveau d'un palier mitotique, par suite d'une anomalie métabolique, inhibant le rythme normal de la division cellulaire.

La normalisation du métabolisme par l'extrait de Trypanosome, lève ce blocage et de ce fait diminue le nombre des éléments demeurant en mitose pendant une durée excessive.

Cette interférence de l'extrait de Trypanosome au sein du métabolisme nucléaire, avait été observée sur le plan cytologique, au moyen de méthodes biochimiques : (Pr COUDERT, ROSKIN, KLYUEVA) affaiblissement de l'hyperchromatisme, diminution de la taille des noyaux, du nombre des nucléoles, de l'indice nucléoplasmatique.

Le parallélisme entre les modifications nucléo-cytoplasmatiques et les résultats obtenus dans la 1^{re} partie de cette étude sur la normalisation des enzymes lactique et succinique, les observations touchant au métabolisme des acides pyruvique et lactique, tous ces faits nous ont amené à préciser le comportement des acides nucléiques sarcomateux, en face du lysat de Trypanosome.

Deux méthodes différentes ont été utilisées. L'une s'attachant à mettre en évidence les modifications chromatiques des acides nucléiques, sous l'influence du lysat ; l'autre visant à une évaluation quantitative.

LA COLORATION A L'ACRIDINE-ORANGE

La coloration de Brachet au vert de méthyle - Pyrroline, avait déjà permis d'observer une diminution du nombre des nucléoles, témoignant d'un abaissement du taux de R.N.A. Cette coloration demeurant toutefois faiblement nuancée, une technique différente a été choisie, qui permettait une meilleure appréciation et aussi une étude plus approfondie de la teneur des cellules cancéreuses, en acides nucléiques.

Principe :

L'imprégnation de cellules par un colorant fluorescent comme l'Acridine - Orange et l'examen des préparations en lumière U.V., permet d'observer des aspects différents selon la nature des acides nucléiques et leur quantité plus ou moins importante.

D.N.A. (noyau cellulaire) :

quantité normale = vert.

quantité plus importante = jaune verdâtre.

quantité anormalement élevée = jaune d'or.

R.N.A. (cytoplasme-nucléole) :

quantité faible = brun vert.

quantité plus importante = brun rougeâtre.

quantité anormalement élevée = rouge vif.

Des cellules cancéreuses, éléments exagérément chargés en acides nucléiques, se devaient de présenter un noyau jaune d'or et un cytoplasme rouge vif.

C'est ainsi qu'apparaissent les cellules de l'ascite d'Ehrlich pour 40 à 80 % d'entre elles, ce taux étant fonction de l'atteinte carcinomateuse, plus ou moins importante, des souris examinées.

Les autres éléments cellulaires sont représentés par des cellules conjonctives, possédant une coloration normale, c'est-à-dire d'un vert plus ou moins soutenu, selon la zone observée : noyau ou cytoplasme.

Toutefois, certaines d'entre elles représenteraient des aspects intermédiaires vers la transformation carcinomateuse, par leur cytoplasme brun rougeâtre et leur noyau un peu jaune.

Les autres éléments sont des cellules endothéliales à noyau vert et à cytoplasme vert, c'est-à-dire à peu près dépourvues de R.N.A.

Cette méthode de cytodiagnostics est appliquée au dépistage des cellules tumorales, contenues dans les exfoliations du tractus digestif, des voies urinaires, du système respiratoire, dans les frottis provenant des organes génitaux féminins. Nous l'avons utilisée pour l'examen des cellules sarcomateuses et pour la mise en évidence des modifications chromatiques du noyau et du cytoplasme, sous l'influence du lysat de Trypanosome.

Technique :

a) *Préparation de la suspension cellulaire, des dilutions d'extrait et des frottis.*

On utilise une concentration de 40.000.000 de cellules/ml dans le liquide de Tyrode modifié ou le liquide de Hanks (pH 7,2) constituant l'un et l'autre des milieux nutritifs favorables à une survie convenable. Dans quatre tubes à hémolyses stériles, contenant des quantités identiques de suspension cellulaire, on effectue les dilutions d'extrait 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000. Un cinquième tube constitue le témoin.

Cette gamme est portée à l'incubation pendant trois heures à 37°.

Ensuite, on procède aux opérations suivantes :

-- Centrifugation des tubes : une minute à mille tours/minute (centrifugation de courte durée, à faible vitesse, afin de ne pas traumatiser les cellules).

— Décantation des 3/4 du liquide surnageant.

-- Agitation du culot cellulaire dans la fraction de liquide restant.

On prépare cinq lames correspondant aux 5 tubes à hémolyse et sur chacune d'entre elles on dépose, au moyen d'une pipette stérile, trois gouttes de suspension cellulaire, prélevée dans le tube homologue.

Les lames sont séchées à l'étuve à 37° pendant trente minutes.

b) *La coloration. Les réactifs en présence.*

1° Alcool à 80°.

2° Alcool à 70°.

3° Alcool à 50°.

4° Acide acétique à 1 %.

5° Solution aqueuse d'Acridine-Orange à 0,10 %.

6° Solution de tampon phosphate préparée comme suit :

1. Dissoudre 9,072 g $\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$ dans 1.000 ml d'eau distillée.

2. Dissoudre 9,465 g $\text{PO}_4 \text{HNa}_2$ dans 1.000 ml d'eau distillée.

Pour obtenir la solution tampon désirée, mélanger :

230 ml solution $\text{PO}_4 \text{H}_2\text{K}$ pH = 6
+ 40 ml solution $\text{PO}_4 \text{HNa}_2$

7° A partir de la solution Acridine-Orange à 0,10 %, on prépare une solution d'Acridine-Orange à 0,01 % dans le tampon-phosphate. Cette deuxième solution d'A-O, servira à colorer les cellules.

8° Solution de $\text{Cl}_2 \text{Ca}$ décimolaire : 11,09 g, $\text{Cl}_2 \text{Ca}$ dans 1.000 ml d'eau distillée.

c) *Mode opératoire.*

Les lames séchées sont immergées successivement

— dans l'alcool à 80°.

— dans l'alcool à 70°.

— dans l'alcool à 50°.

— dans l'acide acétique à 1 %.

— de nouveau dans l'eau distillée.

La durée de toutes ces opérations ne doit pas excéder 30 secondes.

Les préparations sont ensuite plongées pendant une minute dans la solution d'A-O à 0.01 %, puis pendant trois minutes dans le bain de Ca Cl_2 décimolaire.

Après un lavage dans la solution tampon-phosphate, les frottis encore humides sont recouverts d'une lamelle et examinés au microscope en lumière U.V. (Nous avons utilisé le microscope Zeiss-Winkel, dont la lampe est équipée avec un brûleur Osram HBO 200 à vapeur Hg).

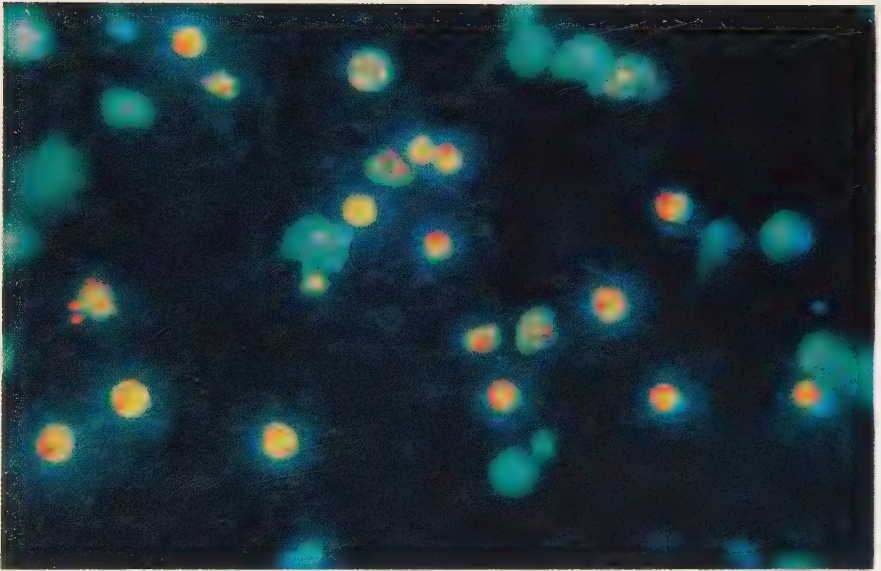
La source de rayons U.V. est fournie par une lampe à vapeur de mercure, à très haute pression. Le microscope est muni de filtres d'excitation destinés à sélectionner la lumière du faisceau lumineux émis par la lampe à vapeur de mercure. Des filtres d'arrêt ensuite empêchent le rayonnement de passer dans le faisceau de l'image observée.

C'est la préparation elle-même qui émet un rayonnement fluorescent. La lumière du faisceau d'excitation vient provoquer cette fluorescence, mais elle n'est pas utilisée dans la formation de l'image. Elle est, au contraire, éliminée par les filtres d'arrêt.

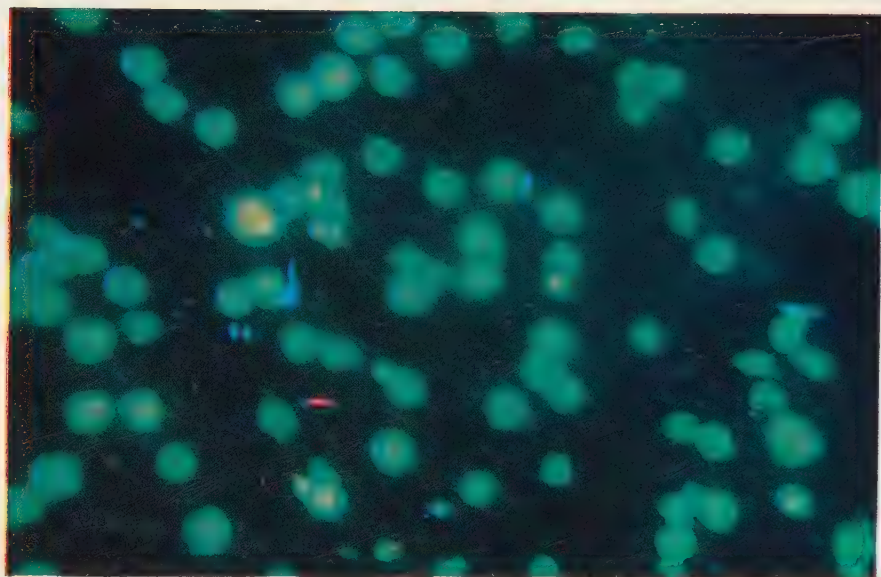
Les Résultats :

Sur la préparation correspondant au tube témoin, on remarque une surabondance de cellules sarcomateuses hyperchromes à cytoplasme rouge flamme, à noyau jaune d'or, contenant un à deux nucléoles rouge vif.

On observe également à côté des anomalies nucléocytoplasmiques, caractéristiques de l'atteinte sarcomateuse, une population disparate, formée d'éléments d'une taille très supérieure à la normale (20 à 30 μ) et d'autres beaucoup plus petits (7 à 8 μ). La préparation correspondant à la concentration de 10 % d'extrait, montre une transformation à peu près complète, parfois totale des cellules



Cellules carcinomateuses d'Ehrlich montrant, après coloration à l'Acridine-Orange et examen en lumière Ultra Violette, une surcharge cytoplasmique en acide ribonucléique : coloration rouge vif du cytoplasme - et une surcharge nucléaire en acide désoxyribonucléique : coloration jaune d'or du noyau.



Cellules carcinomateuses d'Ehrlich après contact avec une concentration à 10 % d'extrait de *Trypanosoma Cruzi* pendant 3 heures à 37°. Après coloration par l'Acridine-Orange, l'examen en lumière Ultra-Violette révèle une disparition de l'hyperchromie nucléocytoplasmique. Les cellules ont alors acquis un noyau vert et un cytoplasme verdâtre témoignant de leur processus de normalisation. On remarque une enclave de RNA extra cellulaire résultant probablement d'un phénomène de décharge.

(En raison de l'extrême difficulté à reproduire sur papier des photographies effectuées en lumière U.V., il a été impossible d'éviter certains phénomènes de diffraction : ils se manifestent par une zone bleutée siégeant de préférence à la périphérie des cellules. Il n'y a pas lieu d'en tenir compte.)

sarcomateuses hyperchromes en cellules conjonctives à cytoplasme brun vert et à noyau vert.

De très rares éléments gardent encore un cytoplasme rouge brique et un noyau jaunâtre. En même temps, on constate une normalisation générale de la taille des cellules, qui ont alors acquis des dimensions moyennes. On observe également des amas de R.N.A. entre les cellules. Ces dépôts paraissent correspondre à un phénomène de décharge lié à l'abaissement de l'hyperchromie.

Au fur et à mesure que diminue la concentration de l'extrait, on voit réapparaître les cellules hyperchromes. Rares encore au niveau de la concentration à 1 %, elles sont plus nombreuses avec 1 % d'extrait. Une concentration à 1/10.000 ne montre qu'un faible abaissement de la proportion, par rapport au témoin, des cellules sarcomateuses.

Ainsi, comme lors des évaluations d'enzymes ou de la détermination de l'index mitotique, la diminution du nombre des cellules tumorales hyperchromes est proportionnelle à la concentration du lysat de Trypanosome.

Des numérations cellulaires ont été effectuées en fonction de quantités croissantes d'extrait trypanosomien.

La diminution proportionnelle du pourcentage des cellules tumorales hyperchromes s'inscrit selon une relation de type linéaire analogue à celles obtenues lors des évaluations d'enzymes.

Toutefois, cette méthode n'étant pas très précise, nous n'en avons pas fait de mention particulière.

Les conclusions que l'on peut tirer de cette expérience mettent en relief un fait digne d'intérêt.

Les phénomènes de normalisation d'ordre enzymatique, biochimique, cytologique, histologique peuvent être ramenés à une cause première, unique et suffisante, qui

laisse entrevoir l'importance de ce mode d'action sur la cellule cancéreuse :

— L'extrait de Trypanosome interfère au niveau des acides nucléiques de la cellule tumorale et déclenche à partir de là, un courant de normalisation métabolique.

Il semble abaisser leur taux exagérément élevé et l'on peut avancer que cet effet porte exclusivement sur une fraction pathologique, puisque la cellule ramenée à des proportions plus normales d'acides nucléiques, continue à vivre.

L'extrait de Trypanosome, sans action sur les acides nucléiques d'une cellule normale, prouve bien que son interférence dans un cas tout à fait particulier de pathologie cellulaire, peut être ramené à une action spécifique.

Mise en évidence par la coloration à l'A. O. de l'inocuité des extraits trypanosoniens à l'endroit de la cellule néoplasique.

L'expérience suivante a été faite dans le but de montrer qu'aucun phénomène lytique direct n'est observé au niveau de la cellule sarcomateuse, traitée par le lysat de Trypanosome et que le mode d'action de celui-ci, ne peut en aucun point, se comparer à celui des agents de la chimiothérapie classique.

On utilise une concentration de 40 millions de cellules par ml, dans le liquide de Hanks, comme milieu nutritif.

Dans deux tubes à centrifuger stériles, à fond large, des quantités égales de suspension cellulaire, sont additionnées d'extrait de Trypanosome : deux dilutions seulement sont faites, celle au 1/10° et celle au 1/100°. Un troisième constitue le témoin.

Les tubes sont portés pendant trois heures au bain-marie à 37°.

Au bout de trois heures, on examine les cellules : le pourcentage de survie est voisin de 90 % dans les trois tubes.

Ceux-ci sont remis à l'incubation à 37°, pendant 24 heures, au bout desquelles les cellules sont de nouveau examinées : le taux de survie est encore très élevé, seuls quelques éléments sont lysés.

De nouveau, les tubes sont remis à l'incubation à 37° pendant 24 heures. A la 51^e heure, la proportion des cellules vivantes demeure toujours élevée dans les trois tubes. On ne remarque aucune différence entre le Témoin et les tubes de dilution. Aucun virage de l'indicateur n'est observé.

Les cellules des trois tubes sont alors colorées à l'Acridine-Orange.

RÉSULTATS.

Tube témoin : Nombreuses cellules sarcomateuses à noyau jaune et cytoplasme rouge.

Tube à 10 % d'extrait : Les cellules sont normalisées dans une proportion de 90 à 95 % environ, l'ensemble du frottis donne l'impression d'un tapis vert.

Tube à 1 % d'extrait : Le pourcentage des cellules normalisées est également très élevé, on rencontre quelques rares éléments hyperchromes.

Le lysat de Trypanosome ne détruit pas la cellule cancéreuse. Il la transforme. *La normalisation qu'il détermine par son action sur les A.N. et qui est un fait acquis au bout de 3 heures à 37°, demeure puisqu'on le met en évidence au bout de 51 heures.*

Il est probable qu'in vivo, le même phénomène se manifeste. Mais, la cellule cancéreuse parvenue à un certain niveau morpho-physiologique, ayant perdu son agres-

sivité sous l'effet du traitement Trypanosomien, devient alors un élément hétérotopique et vulnérable, qui est éliminé par les forces de défense de l'organisme. A ce moment-là seulement, elle sera lysée.

Les cellules traitées par des concentrations de 10 % et de 1 % d'extrait, ont été repiquées sur un milieu de Hanks. Au bout de 48 heures à 37°, les cellules normalisées par l'extrait trypanosomien, demeurent vivantes, la proportion d'éléments lysés reste très faible. Elle est comparable à celle inhérente à toute culture cellulaire.

LE DOSAGE DES ACIDES NUCLEIQUES

La modification du taux des acides nucléiques, mise en évidence par la méthode fluorescente, imposait une évaluation quantitative.

Les acides nucléiques ont été extraits des culots de centrifugation des différentes suspensions de cellules sarcomateuses, mises tout d'abord en contact, pendant un temps déterminé, avec des doses croissantes d'extrait de Trypanosome.

Il existe plusieurs méthodes d'extraction des acides nucléiques :

Méthode de Schmidt et Thannhauer.

Après traitement des tissus par la potasse à 37°, pendant plusieurs heures, les acides nucléiques sont séparés. L'A.R.N. est dégradé en nucléotides acido-solubles, mais l'A.D.N. n'est pas affecté. Par acidification, celui-ci est précipité en même temps qu'une fraction protéique. Son dosage s'effectue par détermination du Phosphore combiné au désoxyribose. Dans le liquide surnageant acide, les nucléotides acido-solubles, dérivés de l'A.R.N., sont également dosées par détermination du phosphore.

Le Phosphore n'étant pas un élément très spécifique des Acides Nucléiques, cette évaluation aurait peut-être l'inconvénient de conduire à des résultats plus ou moins réguliers.

Méthode d'Ogur et Rosen.

L'extraction du R.N.A., se fait après traitement des tissus par l'acide perchlorique à froid, pendant 18 heures. L'extraction du D.N.A., par l'acide perchlorique à chaud.

La teneur en acide nucléique de chaque liquide, peut être mesurée soit par évaluation du phosphore, du pentose ou des bases azotées. L'inconvénient de cette méthode est dû au fait, qu'un peu de D.N.A. peut être extrait par l'acide perchlorique à froid et apparaît dans la fraction à R.N.A.

Nous avons préféré la

Méthode de Schneider.

Extraction des acides nucléiques à chaud par l'acide trichloracétique à 5 %, après séparation par l'acide trichloracétique à 10 % à froid, de fractions pouvant interférer dans le dosage ultérieur. Pour celui-ci, nous avons employé deux méthodes colorimétriques :

Dosage du D.N.A. par la réaction de Dische. Le D.N.A. chauffé en milieu acide avec la diphénylamine développe une coloration bleue, due au désoxyribose des bases puriques.

Dosage du R.N.A. par la réaction de Bial. Le R.N.A. chauffé avec ClH , en présence d'orcine et de perchlorure de fer, donne une coloration verte due au ribose.

I. — L'Extraction des Acides Nucléiques selon la méthode de Schneider

1° Les réactifs en présence :

Acide trichloracétique à 5 %.

Acide trichloracétique à 10 %.

Alcool à 95°.

Mélange alcool-éther (alcool 3 vol. + éther 10 vol.).

Solution physiologique de NaCl à 8,5 ‰.

2° Le matériel :

Un très grand cristalliseur, dans lequel sera préparée une saumure (glace + Cl Na).

Sable de quartz qui servira à broyer les culots cellulaires.

5 tubes à centrifuger à fond rond, d'une capacité de 50 ml.

1 centrifugeuse à grande vitesse.

Petit matériel divers : B M à 37°, piettes, etc...

3° La concentration cellulaire et le milieu nutritif.

Les cellules sarcomateuses présentant une teneur élevée en acides nucléiques, nous avons pensé qu'une quantité voisine de 1 gramme de culot cellulaire, devait permettre un dosage aisé.

Nous avons établi qu'une suspension cellulaire à 50 millions de cellules par ml, pour un volume de 40 ml, correspondait à un culot cellulaire de 0,90 g.

La longueur des opérations : broyage des cellules, extraction puis dosage des acides nucléiques, s'étendant sur un minimum de 48 heures, le temps d'incubation s'est trouvé considérablement allongé. C'est la raison pour laquelle nous avons utilisé un milieu nutritif plus riche permettant une survie cellulaire prolongée : le liquide de Hanks. Cependant, nous verrons ultérieurement qu'en fonction d'un détail de technique, ce milieu a dû être un peu modifié : 2/3 de liquide de Hanks ont été mélangés à 1/3 de liquide de Tyrode.

4° Les dilutions d'extrait Trypanosomien.

Dans 4 tubes à centrifuger d'une capacité de 60 ml, des quantités de 40 ml de suspensions cellulaires à 50 millions de cellules par ml, sont additionnées d'extrait Trypanosomien en dilutions décimales : 1/10, 1/100, 1/1.000, 1/10.000. Un 5° tube constitue le témoin. Ils sont portés à l'incubation à 37° pendant 16 heures.

5° Le Broyage des culots cellulaires :

Les tubes sont alors centrifugés pendant 4 minutes à 4.000 tours/minute. La méthode Schneider sépare les aci-

des nucléiques proprement dits, de la fraction acido-soluble constituée par les nucléotides présents dans le suc cellulaire. La difficulté consiste à éviter l'hydrolyse des acides nucléiques en nucléotides, qui seraient entraînés alors, dans la fraction acido-soluble. Il faut donc éviter toute élévation de température qui provoquerait cette hydrolyse. Après décantation du surnageant, les tubes sont portés dans un bac contenant une saumure maintenue entre -5 et -10° . Chaque culot cellulaire est broyé pendant 5 minutes avec 0,50 g de sable de quartz. Les cellules sont alors désintégrées.

6° Extraction des substances acido-solubles.

Les tubes sont retirés de la saumure et ramenés à une température ne dépassant pas $+4^{\circ}$. La difficulté consiste à freiner la réaction enzymatique d'hydrolyse des acides nucléiques vers la fraction acido-soluble, tout en restant dans des conditions compatibles avec la poursuite de la manipulation.

Les *broyats* sont repris par 8 ml de *sérum physiologique* maintenu à $+4^{\circ}$. On obtient ainsi une pâte homogène à laquelle on ajoute 20 ml d'A.T.C. à 10 % également maintenu à $+4^{\circ}$. Les protéines sont précipitées.

Après centrifugation, on recueille les surnageants dans 5 poudriers réservés à cet effet.

Les culots sont repris par 5 ml d'A.T.C. à 10 %.

Après une nouvelle centrifugation, les surnageants sont décantés et réunis aux précédents. *On obtient ainsi les différentes fractions acido-solubles.*

7° Extraction des acides nucléiques.

Les tubes contenant les différents culots cellulaires sont additionnés de 5 ml d'A.T.C. à 5 % et maintenus au B.-M. pendant 15 minutes, à 90°C .

Après centrifugation, les surnageants sont recueillis dans 5 tubes jaugés de 10 ml, correspondant chacun au tube homologue de la gamme en cours d'étude.

Les culots sont repris par 2,5 ml d.A.T.C. à 5 % froid. Après une nouvelle centrifugation, les surnageants sont réunis aux précédents.

On complète les volumes à 10 ml avec l'A.T.C. à 5 %. On filtre. Les 5 fractions trichloracétiques ainsi séparées contiennent à la fois le D.N.A. et le R.N.A.

Elles sont maintenues à + 4°, jusqu'au moment du dosage.

II. — Le Dosage proprement dit

1° Le dosage du D.N.A.

La réaction de Dische. Le D.N.A. chauffé en milieu acide avec la diphénylamine donne une coloration bleue due au désoxyribose des nucléotides puriques.

La lecture colorimétrique se fait sous 6.000 Å.

Composition du réactif	{	Diphénylamine	1 g
		Acide acétique crist.	100 ml
		SO ₄ H ₂ d = 1,85	2,5 ml

Le dosage s'effectue dans des tubes à colorimétrie.

Tube Réaction	{	Solution contenant le D.N.A.	2 ml
		Réactif	4 ml
Tube Témoin	{	H ₂ O distillée	2 ml
		Réactif	4 ml

Les tubes sont maintenus au B.-M. bouillant pendant 10 minutes. La couleur bleue se développe. Refroidis ensuite sous un courant d'eau, la lecture se fait 30 minutes plus tard, le spectrophotomètre ayant été mis au zéro avec le tube témoin.

Courbe étalon de D.N.A. Une solution titrée de D.N.A. est préparée à partir d'un échantillon hautement polymérisé. Les solutions étalon doivent être aussi voisines que possible, de celles dans lesquelles on dose le composé. Il y a donc intérêt à traiter de la même manière la solution étalon et la solution à étudier.

Le D.N.A. est peu soluble dans l'eau, par contre son sel de sodium est soluble. Il faudra donc ajouter au préalable quelques gouttes de solution de soude N/100 à l'échantillon de D.N.A.

On procède comme suit :

— Un échantillon de D.N.A. pesé à la balance de précision est dissous dans q.s. de soude N/100 et additionné d'A.T.C. à 5 %. La solution se trouble, puis redevient limpide après hydrolyse. Le chauffage est maintenu 15 minutes à 90°C.

La courbe d'étalonnage établie à partir de la solution précédente, montre que la loi de Beer est vérifiée, pour des concentration allant de 10 γ à 150 γ de D.N.A. par ml.

2° Le dosage du R.N.A.

La réaction de Bial. Le R.N.A. chauffé en milieu chlorhydrique avec de l'orcine et du perchlorure de fer, développe une coloration verte due au ribose.

Cette réaction est basée sur les considérations suivantes :

— des pentoses chauffés en milieu acide donnent par oxydation des dérivés furfuroliques. Ceux-ci ont la propriété de se combiner à des polyphénols comme l'orcine $C_6H_3CH_3(OH)_2$, en donnant des pigments caractéristiques.

Composition du réactif de Mejbaum :

— solution d'orcine à 10 mg par ml, dans un mélange contenant 0.1 % de $Cl_3 Fe 6H_2O$ dans $Cl H$ concentré.

Ce réactif ne peut être conservé, on le prépare extemporanément. De couleur jaune, il vire au vert en quelques heures s'il est exposé à la lumière et laissé à la température du laboratoire.

L'orcine cristallisée qui sert à sa préparation doit être conservée à $+4^{\circ}$ et à l'obscurité. Hors de ces conditions, elle s'altère et le réactif obtenu devient vert après un bref chauffage au bain-marie. Normalement, il doit rester jaune, même après un chauffage dépassant 30 minutes. D'où, l'absolue nécessité de faire un tube témoin réactif, lors des dosages du R.N.A.

Le dosage s'effectue dans des tubes à colorimétrie.

Tube Réaction	Solution contenant le R.N.A.	1 ml
	Réactif	1 ml
Tube Témoin	H ₂ O distillée	1 ml
	Réactif	1 ml

Les tubes sont portés au bain-marie bouillant pendant 20 minutes. Refroidis sous un courant d'eau, ils sont additionnés de 1 ml d'éthanol à 95° , qui solubilise le pigment vert. La lecture se fait sous $6.000 \text{ \AA}$.

Courbe étalon du R.N.A. On procède comme pour le D.N.A. Un échantillon de R.N.A. déterminé, est solubilisé dans l'A.T.C. à 5 % et hydrolysé 15 minutes, au bain-marie à 90° . La courbe étalon est conforme à la loi de Beer, entre 10 et 200 γ de R.N.A. par ml.

La correction due au D.N.A. L'extraction des acides nucléiques a réuni dans une même solution, le R.N.A. et le D.N.A. Or celui-ci, en temps que pentose, donne également avec l'orcine, une coloration verte, plus faible cependant. Il faut donc apporter à l'évaluation du R.N.A. une correction due au D.N.A. Le facteur de correction est

$$\frac{D^{\circ} \text{ D.N.A.}}{D^{\circ} \text{ R.N.A.}}$$

calculé en établissant le rapport ——— pour les diffé-

$$D^{\circ} \text{ R.N.A.}$$

rentes concentrations d'acides nucléiques intéressant les gammes étalon et en faisant ensuite la moyenne. Il est égal à 0,43. Ce chiffre assez élevé est probablement imputable au très haut degré de polymérisation du D.N.A. utilisé.

III. — Les résultats de la première expérience

La 1^{re} expérience effectuée dans les conditions précédemment décrites, laissait apparaître dès la lecture des D°, certaines singularités aussi bien dans la fraction des acides nucléiques que dans la fraction acido-soluble.

FRACTION ACIDES NUCLEIQUES		
Gamme cellulaire contenant les dilutions d'extrait	D° D. N. A.	D° R. N. A.
1/10	14,5	45
1/100	12	33
1/1000	13,5	34,5
1/10.000	13	36
T	14	38
FRACTION ACIDO SOLUBLE		
Gamme cellulaire contenant les dilutions d'extraits	D° D. N. A.	D° R. N. A.
1/10	7	34,8
1/100	6	11
1/1000	7	11,2
1/10.000	6	12
T	6,6	12

TABLEAU N° I

La lecture de ces chiffres, permettait de dégager les points suivants :

1° *Une certaine fixité du D.N.A. :*

- augmentation discrète (par rapport au témoin) au contact d'une forte concentration d'extrait.
- avec des doses moyennes et faibles, léger abaissement.

2° *Des modifications très importantes au niveau du R.N.A. :*

- augmentation massive d'acide ribonucléique sous l'effet de fortes concentrations d'extrait.
- légère diminution avec des concentrations plus faibles.

Ces premiers résultats s'opposant à ceux obtenus avec la méthode à l'Acridine-Orange, nous avons tout d'abord multiplié les expériences, afin de localiser une erreur éventuelle.

Diverses modifications furent apportées, concernant le milieu nutritif et le temps d'incubation, mais la concentration cellulaire de 50 millions de cellules par ml, correspondant à un culot cellulaire de 0,90 g ne fut jamais changée.

IV. — **Les diverses expériences de contrôle
et les modifications apportées**

- | | |
|---------------|---|
| 2° Expérience | 18 heures d'incubation à 37°.
Liquide de Hanks. |
| 3° Expérience | 3 heures d'incubation à 37°.
24 heures à 20°.
Liquide de Hanks. |

- 4^e Expérience 18 heures d'incubation à 37°.
Milieu nutritif : liquide de Hanks 2/3
 liquide de Tyrode 1/3
L'addition de liquide de Tyrode permettait d'obtenir après centrifugation, un culot mieux récupérable, plus compact.
- 5^e Expérience 8 heures d'incubation à 37°.
 14 heures à — 5°.
Milieu nutritif : liquide de Hanks 2/3
 liquide de Tyrode 1/3
- 6^e Expérience 3 heures d'incubation à 37°.
 15 heures à — 5°.
Milieu nutritif : liquide de Hanks 2/3
 liquide de Tyrode 1/3

Ce dernier essai avait pour but, en réduisant le temps d'incubation à 3 heures, de placer l'expérience dans des conditions identiques à celles qui ont présidé aux évaluations d'enzymes et à la coloration à l'Acridine-Orange. Cette expérience confirmait en outre, la rapidité d'action des extraits trypanosomiens sur la cellule sarcomateuse, dans leur interférence au niveau des acides nucléiques.

V. — Les résultats des expériences précédentes Commentaires

Malgré des conditions expérimentales un peu différentes d'un essai à l'autre, les courbes obtenues sont toutes de même type et confirment la validité de la 1^{re} expérience:

Les résultats de la méthode à l'A.O. et l'évaluation quantitative, sont donc divergents en certains points.

Mais, avant de dégager les conclusions générales que suggère l'ensemble de ces données, le mode opératoire précédent, demande à être commenté.

a) L'importance de la fraction acido-soluble.

Les D° traduites en γ par ml d'acides nucléiques, objectivaient dans les différents essais, une fraction acido-soluble importante.

La moyenne des six expériences donnaient pour le D.N.A., une proportion de 24 %. Pour le R.N.A., 45 %.

Dans ces conditions, il apparaissait donc que la fraction acido-soluble, contenait en plus des oligonucléotides existant dans le suc cellulaire, des produits d'hydrolyse des acides nucléiques. Il faut donc en conclure qu'une élévation de température a permis le jeu des enzymes.

Deux faits peuvent être invoqués :

— soit un broyage trop prolongé des culots cellulaires, ayant entraîné un échauffement ;

— soit que le blocage enzymatique ait été incomplet, l'expérience n'ayant pas été conduite à une température suffisamment basse.

Ce qui aurait pu représenter un inconvénient majeur, dans la détermination exclusive de la fraction acides nucléiques au sein d'un tissu ou d'un groupe cellulaire particulier, ne paraît pas en être un dans l'étude présente.

Il n'est pas dépourvu d'intérêt de doser dans la fraction acido-soluble à la fois les produits de dégradation de l'acide ribonucléique et les nucléotides libres, présents dans le suc cellulaire. Ceux-là entrent en effet pour une part dans la synthèse du R.N.A. Or, comme celle-ci aboutit, au niveau de la cellule sarcomateuse à l'édification d'un substrat pathologique, il y a lieu de tenir compte de ces matériaux.

C'est pour cette raison qu'une évaluation globale a été faite : R.N.A. de la fraction acides nucléiques plus R.N.A. acido-soluble.

Pour le D.N.A. il en a été de même, mais la fraction D.N.A. acido-soluble provient alors essentiellement de l'hydrolyse partielle du D.N.A. nucléaire, ce qui est une raison de plus d'en tenir compte.

En fonction de ces diverses considérations, les courbes moyennes suivantes ont été établies :

	D. N. A.	R. N. A.
Dilutions	γ /ml	γ /ml
1/10	42,3	42,2
1/100	31,5	20,7
1/1000	41,3	23,5
1/10.000	35,4	25,8
T	36,7	25,5

TABLEAU N° II

b) Les proportions relatives D.N.A./R.N.A.

On observe au sein de la cellule sarcomateuse d'Ehrlich, une quantité de D.N.A. supérieure à celle de R.N.A. Cela ne saurait surprendre si l'on songe à l'abondance du matériel nucléaire des cellules cancéreuses.

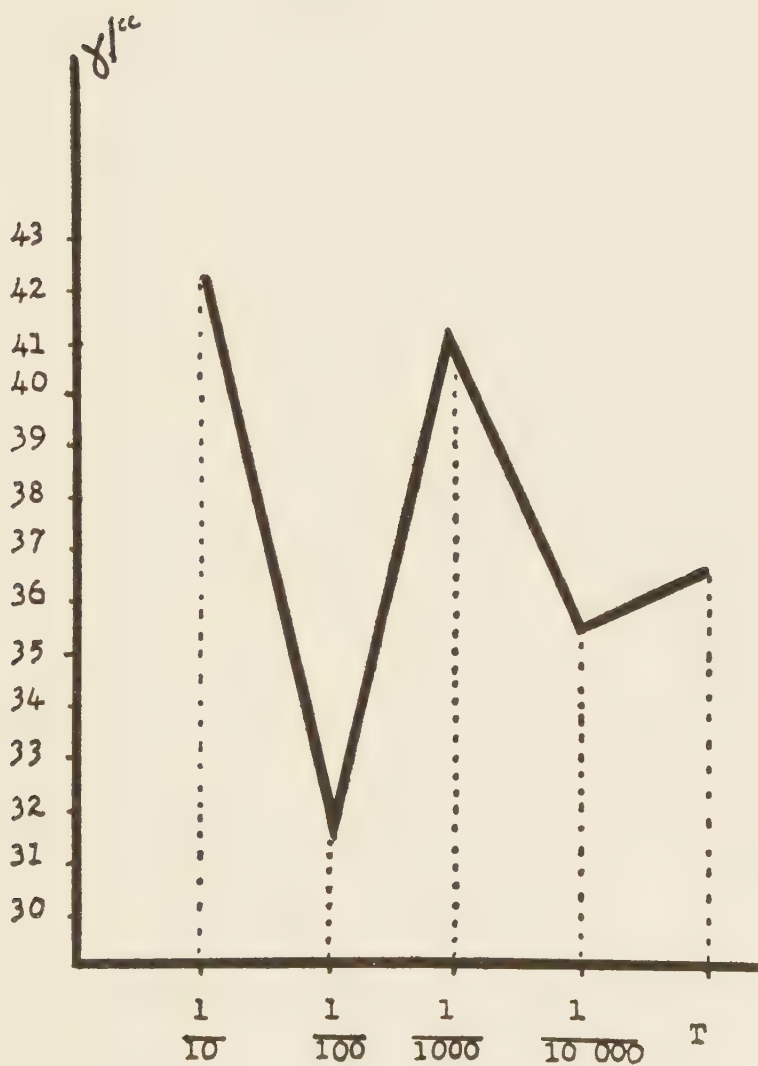
Ainsi, dans le carcinome de Flexner, le sarcome de Jensen, le carcinosarcome de Walker, les cellules ont également une proportion de D.N.A. supérieure à celle du R.N.A. Si l'on étudie pour chaque concentration d'extrait,

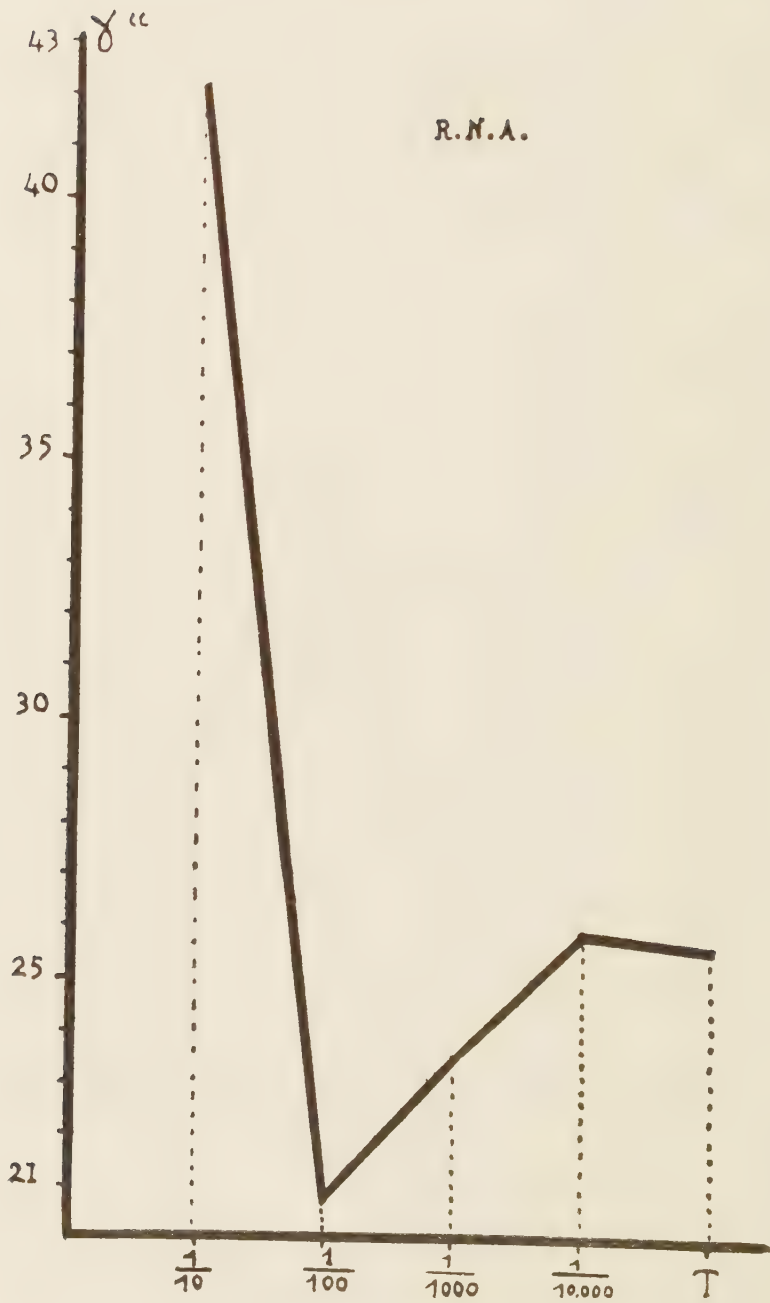
D.N.A.

le rapport ——— cellulaire, on constate qu'une forte con-
R.N.A.

centration ramène les deux acides nucléiques, à des proportions identiques, plus proches de la normale.

D.N.A.





Au fur et à mesure que diminue la proportion d'extrait, le taux de D.N.A. s'élève peu à peu au-dessus de celui de R.N.A. et 1/10.000° d'extrait ne détermine pratiquement plus de différence avec le taux des acides nucléiques des cellules témoins.

Le tracé des courbes déjà commenté lors de l'expérience n° 1 met l'accent sur le fait suivant :

— deux phénomènes opposés se manifestent, fonction l'un et l'autre, des concentrations d'extrait :

— augmentation des acides nucléiques, sous l'effet de fortes concentrations ;

— abaissement au contact de doses moyennes ou faibles.

L'*objection* que l'on peut apporter à l'accroissement du taux des acides nucléiques, sous l'effet de concentrations importantes d'extrait, est l'apport d'acides nucléiques trypanosomiens, qui seraient également dosés au niveau du culot cellulaire.

c) Les acides nucléiques trypanosomiens.

Une ampoule d'extrait de trypanosome révèle après extraction trichloracétique les proportions suivantes d'acides nucléiques :

R.N.A.	90 γ /ml
D.N.A.	24 γ /ml

Le traumatisme imposé aux corps parasites, durant la lyophilisation, entraînant une désagrégation cytoplasmique plus ou moins profonde et sans doute aussi une atteinte nucléaire, il y avait lieu de supposer qu'une quantité importante d'acides nucléiques trypanosomiens, devait se retrouver dans le liquide nutritif.

Il y aurait alors la possibilité de mettre en évidence une modification éventuelle de leur taux, pendant la durée nécessaire à l'effet normalisateur de l'extrait, c'est-à-dire trois heures.

L'expérience suivante a montré qu'ils demeurent à un taux constant pendant plusieurs heures consécutives.

Peut-on en déduire qu'il en est de même de la totalité des acides nucléiques que révélerait l'extraction trichloracétique ? C'est une hypothèse probable. Celle-ci, qui aurait nécessité une expérimentation particulièrement longue, n'a pu être faite.

d) Recherche et dosage des acides nucléiques trypanosomiens dans le milieu nutritif.

Cette opération est rendue très délicate pour les deux raisons suivantes :

1° *La présence de glucose* dans le liquide de Tyrode.

2° *La présence de lactose* comme substrat des trypanosomes lyophilisés *dans les ampoules d'extrait*.

Les solutions de *pentose* chauffées au bain-marie en *milieu chlorhydrique*, en présence d'*orcine*, donnent naissance à un pigment *vert*, dû à la formation de dérivés furfuroliques. C'est le principe du dosage du ribose. Or, les *hexoses*, chauffées dans les mêmes conditions, donnent une coloration *rouge*.

Dans ces conditions, le glucose du liquide de Tyrode rendait imprécise la caractérisation du ribose. Nous avons utilisé un *milieu nutritif dépourvu de glucose*. Il était évident qu'un liquide de Tyrode, ramené à une solution d'électrolytes, rendait les conditions nutritives très précaires et ne devait pas laisser espérer une survie prolongée des cellules. Une durée de trois heures suffisait.

La seconde difficulté tenait à la présence de lactose dans les ampoules d'extrait. Son hydrolyse en glucose + galactose lors du chauffage avec le réactif à l'orcine, ramenait au cas précédent.

Nous avons tablé sur une chronologie.

La coloration verte du ribose, devait logiquement apparaître avant la teinte rouge, caractéristique des deux hexoses, résultant de l'hydrolyse du lactose. C'est précisément ce qui s'est produit, mais le temps de chauffage au bain-marie à dû être ramené à 15 minutes au lieu de 20 minutes, car après 1/4 d'heure, la teinte vert franc du ribose, devient peu à peu marron.

En dépit de ces modifications, qui n'ont certainement pas toute la rigueur scientifique désirable, l'expérience a été conduite de la façon suivante :

1^{er} ESSAI :

2 tubes à centrifuger d'une capacité de 60 ml.

Tube I - Témoin : 40 ml de liquide de Tyrode, sans glucose, sont additionnés de 10 % d'extrait filtré et lyophilisé de trypanosome.

Tube II : 40 ml d'une suspension de cellules sarcomateuses dans le liquide de Tyrode, sans glucose, sont additionnés de 10 % d'extrait filtré et lyophilisé.

Il est très important d'utiliser pour ces deux tubes qui doivent être comparés, des ampoules appartenant au même lot. La teneur en acides nucléiques, comme nous avons eu l'occasion de le constater, varie parfois un peu d'un lot à l'autre.

R.N.A.

Tube I : Aussitôt après addition de l'extrait, le dosage est effectué : R.N.A. = 51,3 γ par ml. Ce dosage n'est fait qu'une fois.

Tube II : Le dosage ne peut être entrepris immédiatement, il faut attendre la sédimentation cellulaire.

Après une heure d'incubation à 37°, le taux de R.N.A. du surnageant libre d'éléments cellulaires, s'élève à 50 γ /ml.

Après deux heures : 51 γ /ml.

Après trois heures : 51 γ /ml.

D.N.A.

Il a été recherché dans les deux tubes.

Dans l'un comme dans l'autre, on retrouve des quantités sensiblement égales, faibles, ne dépassant pas 4 à 5 γ /ml.

2^e ESSAI :

Dans des conditions identiques :

R.N.A.

Tube I : 51 γ /ml.

Tube II : après 1 heure à 37° : 51,5 γ /ml.

— 2 h 30 — : 51 γ /ml.

— 4 h 30 — : 53 γ /ml.

D.N.A.

Demeure compris aux alentours de 5 γ /ml dans les 2 tubes.

3° ESSAI :

R.N.A.

Tube I : 38 γ /ml.

Tube II : après 1 heure à 37° : 37 γ /ml.

— 2 — : 38,5 γ /ml.

— 3 — : 38 γ /ml.

— 5 — : 40 γ /ml.

D.N.A.

Dans l'un et l'autre tube, on ne trouve que des traces.

Deux remarques s'imposent :

1° La lyophilisation a profondément désintégré le cytoplasme des parasites puisque le taux de R.N.A., atteint des valeurs assez élevées. Il n'en est pas de même pour les noyaux parasitaires, le taux de D.N.A. demeurant faible.

2° Après trois heures, aucune modification du taux des acides nucléiques n'est décelable. Le R.N.A. présente une remarquable fixité.

Malgré l'imprécision de la méthode, on croit pouvoir conclure, que les extraits trypanosomiens retrouvés dans le liquide nutritif ne sont pas fixés par les cellules en quantité massive.

Au moyen de la méthode fluorescente, une deuxième épreuve a été faite, afin de déterminer si au bout d'un temps exagérément prolongé, les acides nucléiques du surnageant ne se fixaient pas sur les cellules cancéreuses, ramenées à une affinité chromatique normale.

Une gamme de cellules sarcomateuses en milieu de Hanks, est additionnée de quantités croissantes d'extrait et maintenue à l'incubation pendant 24 heures à 37°. Au bout de ce temps, elles sont colorées à l'acridine-orange

et examinées en lumière U.V. : la normalisation de l'affinité chromatique, observée ordinairement au bout de trois heures à 37°, *demeure* après 24 heures. Les cellules traitées avec 10 % d'extrait, ont acquis noyau vert et cytoplasme vert. On n'observe aucun phénomène de surcharge.

Cette expérience paraît corroborer les conclusions précédentes.

Il est regrettable de ne pouvoir pousser plus loin l'investigation, jusqu'à l'échelle moléculaire, car devant le bouleversement métabolique et morphologique, dont est l'objet la cellule cancéreuse sous l'effet du lysat, il y a lieu de supposer l'intervention du D.N.A. trypanosomien.

Diverses causes d'erreurs ayant été éliminées, on peut donc tabler sur les conclusions déjà indiquées après la première expérience :

— la constance relative du D.N.A.,

— les modifications majeures du taux de R.N.A., qui se trouve massivement augmenté, avec les fortes concentrations d'extrait, et seulement abaissé avec des doses moyennes et faibles.

Donc, deux phénomènes inverses se manifestent, fonction l'un et l'autre de la concentration de l'extrait de Trypanosome.

L'augmentation des acides nucléiques sous l'influence de concentrations élevées d'extrait, paraît, a priori, s'opposer aux résultats de la méthode cytochimique. En réalité, les deux techniques se complètent, car elles font entrevoir chacune, les différents aspects d'un même phénomène.

Les réactions de Dische et de Bial hydrolysent la molécule d'acide nucléique et amènent à la caractérisation et à l'évaluation distincte d'un élément déterminé : le ribose ou le désoxyribose.

Le phénomène de *l'accroissement du taux des acides nucléiques pour les fortes concentrations d'extrait*, serait demeuré *insoupçonné avec la coloration à l'acridine-orange*.

Inversement, celle-ci rend compte d'un résultat qualitatif en montrant la molécule d'acide nucléique ramené à une affinité chromatique normale. Elle révèle aussi les *profondes modifications métaboliques qui n'ont pas altéré le potentiel vital de la cellule, mais qui ont abaissé son pouvoir pathogène*, comme nous le montrerons plus loin.

Elle objective un *phénomène progressif* évoluant de façon régulière : la transformation des cellules hyperchromes en éléments d'affinité chromatique, se rapprochant de la normale, *est constante et proportionnelle à la concentration* de l'extrait.

Cette modification tinctoriale suggère la mise en jeu de désoxyribonucléases et de ribonucléases, atteignant profondément les structures moléculaires. Toutefois, cette hydrolyse paraît être le résultat d'une action très complexe. Ceci est suggéré par les observations suivantes :

On remarque en dehors des cellules, des enclaves de R.N.A. libres, plus ou moins importantes ou irrégulières, paraissant résulter d'un phénomène d'expulsion.

Il n'en est pas de même pour le D.N.A. : on ne retrouve jamais de dépôt de D.N.A. extracellulaire.

Pourtant, la dégradation de ces deux acides, paraît atteindre le même niveau moléculaire, puisque dans les deux cas, les affinités tinctoriales sont normalisées.

Un apport pur et simple de ribonucléase dans le milieu nutritif des cellules, ne laisserait subsister aucune enclave ribonucléique extracellulaire, qui échapperait alors à la dégradation enzymatique, tandis que le R.N.A. sarcomateux intracellulaire aurait été hydrolysé.

Comme l'indique POLONOVSKI : si l'on suppose un D.N.A. étranger, isolé d'un organisme possédant un enzyme et utilisant un substrat donné, on peut concevoir que ce même D.N.A., soit capable « de communiquer à une souche inactive, le pouvoir de former cet enzyme et d'utiliser le substrat correspondant ». C'est le phénomène de l'*induction enzymatique*.

Ainsi, le D.N.A. trypanosomien pourrait amener à la synthèse d'une désoxyribonucléase. Cet enzyme induit, de fonction et de structure normales, dégraderait partiellement, c'est-à-dire utiliserait le substrat désoxyribonucléique jusqu'à un stade compatible avec la resynthèse d'un D.N.A. et d'un R.N.A. normalisés, celui-ci effecteur d'une construction protéique normale.

Ainsi serait précisée sous une optique différente, c'est-à-dire dans le sens d'un processus d'induction enzymatique au niveau de la cellule tumorale la notion d'un principe actif trypanosomien d'ordre enzymatique que mettaient en évidence les expérimentations antérieures.

Il est possible que *la totalité des matériaux issus de la dégradation du D.N.A. sarcomateux, soit utilisée sur place*, dans la formation de *nouvelles structures moléculaires d'affinité tinctoriale différente*.

C'est l'une des raisons pour lesquelles il n'y aurait pas d'enclave de D.N.A. Quant à la ribonucléase, induite elle aussi, mais comme conséquence du remaniement nucléaire, elle serait l'agent intracytoplasmique de la lyse des R.N.A. pathologiques, dont l'excès serait rejeté dans le milieu extérieur.

Il n'est pas exclu que l'induction enzymatique s'effectue également sur la totalité des enzymes enduits par les extraits trypanosomiens, enzymes du cycle de Krebs, déshydrogénases phosphorylantes, mais il paraît plus vraisemblable de ne considérer que l'induction d'une désoxyribonucléase. Le rôle de celle-ci est objectivé par la méthode cytochimique. Elle explique la normalisation de l'architecture nucléaire libérée d'une enzymogenèse anormale et point de départ d'une enzymogenèse normalisée.

A l'appui de ces différentes données, on pourrait expliquer les faits de la façon suivante :

— *au sein de la cellule sarcomateuse, les D.N.A. et R.N.A. pathologiques s'accumulent* : Accumulation en majeure partie sans avenir, laissant subsister quelques synthèses enzymatiques aberrantes, génératrices de systèmes plus ou moins viables, qui orientent la cellule vers l'anaérobiose.

— Une faible fraction de D.N.A. normal peut demeurer, inducteur d'enzymes normaux qui tenteront de maintenir les processus aérobie. D'où interférence de deux métabolismes, cela déjà soupçonné lors de l'étude des courbes irrégulières de la L.D.H.

Sous l'influence de l'extrait, se produit dans un premier temps, la dégradation des acides nucléiques sarcomateux : fluctuations modérées du D.N.A. ayant une incidence considérable sur le R.N.A.

Cette constance relative du D.N.A. est à rapprocher de l'absence d'enclave de D.N.A. extracellulaire, alors que le R.N.A. morphologiquement dégradé, est expulsé par fragments en dehors de la cellule.

Dans un second temps, la réutilisation in situ de matériaux désoxyribonucléiques pathologiques vers une construction nucléaire normale peut modifier en même

temps l'affinité tinctorale, et développer une enzymogénèse normale. Ces diverses remarques s'accordent avec l'hypothèse précédemment formulée, d'une désoxyribonucléase induite par les D.N.A. trypanosomiens, qui serait le facteur déterminant des modifications métaboliques.

IV• PARTIE

MODIFICATIONS DU POUVOIR CARCINOGENETIQUE

Le retour au jeu normal de certains mécanismes biologiques perturbés, l'abaissement du taux des acides nucléiques que paraît accompagner un remaniement structural, incitaient à rechercher si parallèlement le pouvoir pathogène de la cellule sarcomateuse se trouvait diminué.

L'expérience suivante qui a porté sur 15 souris paraît fournir un argument en faveur de cette hypothèse. Elle corrobore celles effectuées en 1950 par le Pr COUDERT et JUTTIN sur le sarcome greffé du rat, en 1958 par le Pr COUDERT et Mlle BATTESTI sur le sarcome T8 de Guérin, ainsi que les travaux de ROSKIN et KLYUEVA.

MODE OPÉRATOIRE.

Des quantités égales d'une *suspension de cellules sarcomateuses à 40 millions de cellules par ml, en milieu de Hanks* sont réparties en 3 tubes stériles.

Le premier tube est additionné de 10 % d'extrait trypanosomien.

Le deuxième tube est additionné de 1 % d'extrait.

Le troisième tube contient la suspension virulente.

Les suspensions sont laissées en incubation à 37°C pendant 3 heures.

Les 15 souris sont réparties en trois groupes :

Le 1^{er} lot de 5 animaux est inoculé par voie intrapéritonéale avec 0,5 ml de la suspension à 10 % d'extrait.

Le 2^e lot avec 0,5 ml de la suspension à 1 % d'extrait.

Le 3^e lot est inoculé avec 0,5 ml de suspension virulente. C'est le témoin.

55 jours après l'inoculation, les souris vivantes se répartissent comme suit :

— 4 souris inoculées avec la suspension à 10 % d'extrait, soit une proportion de 80 %.

— 2 souris inoculées avec la suspension à 1 % d'extrait, soit une proportion de 40 %.

Les souris vivantes sont particulièrement vigoureuses et ne présentent aucun signe d'ascite commençante.

Les 5 souris témoins sont mortes entre le 19^e et le 32^e jour.

Au 37^e et au 45^e jour, après l'injection, mort de 2 souris inoculées avec la suspension à 1 %.

Au 4^e et au 8^e jour, après l'injection, soit phénomène de choc, soit infection intercurrente, 2 souris sont mortes sans développer l'ascite caractéristique, l'une inoculée avec la suspension à 1 %, l'autre avec la suspension à 10 %.

L'abaissement du pouvoir pathogène en fonction de la concentration de l'extrait de trypanosome paraît être la conclusion de cette expérience.

Le taux de 1 % s'est avéré insuffisant. Il a simplement déterminé une évolution retardée. Avec une concentration 10 fois plus élevée, la maladie n'est pas déclarée après l'inoculation et la santé des animaux demeure très bonne.

C'est pourquoi l'abaissement du pouvoir pathogène doit être compris en fonction de la concentration de l'extrait, mais aussi en fonction de l'importance du foyer tumoral qui va de pair avec son ancienneté.

En clinique, ces notions seront traduites par la nécessité d'un traitement précoce, intense et prolongé.

Nous avons cherché si la cellule sarcomateuse modifiée dans sa morphologie et sa physiologie avait acquis le pouvoir antigénique et suscitait la formation d'anticorps protecteurs.

Les 6 souris survivantes ont été réinoculées chacune avec 0,5 ml d'une suspension virulente de cellules sarcomateuses à 40 millions de cellules par ml.

Les 2 premières souris sont mortes peu de temps après la réinoculation, sans présenter d'ascite. Chez les 4 autres, l'apparition de l'ascite s'est faite dans un délai normal, identique à celui observé chez l'animal neuf après greffe de la tumeur.

La souris n'est donc pas immunisée.

Mais, dans la complexité du problème de l'immunologie anticancéreuse, les anticorps normaux lorsqu'ils sont mis en évidence (Frazer, A.C. fluorescents), doivent-ils être envisagés comme des anticorps anticellules tumorales ou des anticorps antiviraux ? Dans le cas du carcinome d'Ehrlich, des anticorps antiviraux, anticellules n'ont pas été découverts et la cellule carcinomateuse métaboliquement et morphologiquement modifiée par les extraits trypanosomiens n'acquiert pas de pouvoir antigénique.

L'ensemble de ces expériences a été effectué sur un nombre restreint d'animaux. Il y aurait lieu de le reprendre sur une échelle plus large.

CONCLUSION GENERALE

La cellule cancéreuse paraît constituer une entité autonome. Elle s'est dégagée, d'après les notions actuellement admises, des lois qui réglementent la genèse des cellules et leur reproduction normale, elle a acquis des caractères stables et permanents qu'elle transmet à sa descendance.

Cette déviation enzymatique implique une atteinte du génome par modification structurale d'un ou de plusieurs acides nucléiques.

Si un agent venu de l'extérieur, particule virale intégrant son matériel génétique à celui de la cellule, induit une mutation dans le choix ou la séquence caractéristique du D.N.A. spécifique, il détermine une construction protéique différente.

Il en est de même des radiations qui altèrent la structure des acides nucléiques. Certaines substances chimiques connues pour provoquer l'apparition de cancers expérimentaux, ont également leur point d'impact sur l'appareil génétique. Tous ces facteurs d'agression sont des inducteurs de mutation néoplasique.

Malgré l'acquisition de caractères stables et permanents, héréditairement transmissibles, la cellule cancéreuse demeure un élément dystrophique qui traduit sa souffrance par des manifestations multiples : *troubles de la maturation* avec asynchronisme évolutif nucléo-cytoplasmique et augmentation du rapport nucléoplasmatique, *troubles de la reproduction* avec augmentation de l'indice mitotique,

monstruosités cellulaires par mitoses multipolaires, *troubles métaboliques* avec déviation anaérobie.

L'hyperchromatisme nucléo-plasmatique témoigne d'une accumulation d'acides nucléiques inutilisés.

La normalisation de cet ensemble pathologique par le D.N.A. trypanosomien est la preuve de son acceptation et de son utilisation par la cellule sarcomateuse. Il est donc probable qu'elle l'intègre à son matériel génétique. A partir de ce stade, il y aurait induction enzymatique de nucléases, avec dégradation des acides nucléiques sarcomateux, suivie d'une reconstruction normalisée.

Peut-on parler d'une nouvelle mutation ? d'un retour permanent à un état normal antérieur ? ou d'une modification temporaire ? Des études ultérieures devront s'attacher à élucider ce point.

Dans l'état actuel de nos connaissances, on peut dire que de très larges perspectives paraissent s'ouvrir dans nos moyens d'action sur la cellule cancéreuse.

C'est la conclusion formelle qui se dégage de cette étude.

**

Que l'on nous excuse de présenter un travail que nous savons incomplet. Il n'a d'autre but que de laisser entrevoir de nouvelles perspectives de recherches vers les possibilités de modifications directes de la biologie de la cellule tumorale. Nous espérons avoir l'honneur d'être associée aux travaux qui ne manqueront pas de se poursuivre dans cette voie au Laboratoire de Parasitologie.

CONCLUSIONS

I. — Les résultats observés dans l'utilisation des extraits de *Trypanosoma cruzi*, expérimentalement et en clinique, par les chercheurs russes de l'école de ROSKIN et de KLYUEVA, et par les chercheurs lyonnais, ont attiré l'attention sur les effets normalisateurs du métabolisme vicié de la cellule néoplasique.

II. — Nous avons continué ces recherches en étudiant les modifications de la glycolyse aérobie. La déshydrogénase lactique, la déshydrogénase succinique, libérées dans un milieu artificiel, par les cellules sarcomateuses d'Ehrlich isolées, ont montré un abaissement des taux exagérés de ces enzymes, proportionnel aux concentrations du milieu de survie en extrait filtré et lyophilisé de *Trypanosoma cruzi*.

III. — Les taux d'acide lactique et pyruvique libérés varient selon des fonctions inverses, liées également aux concentrations d'extrait de *Trypanosoma cruzi*.

IV. — Remontant aux modifications nucléaires, seules capables d'expliquer l'ensemble des actions observées, nous avons constaté par la coloration de fluorescence à l'acridine-orange, la disparition des acides désoxyribonucléiques et ribonucléiques de surcharge des cellules du sarcome d'Ehrlich, sous l'influence de ce même extrait, témoignant d'une profonde modification structurale.

V. — Le dosage des acides désoxyribonucléiques a permis de constater que leur taux varie peu, malgré les transformations cytochimiques précédemment observées. Pour les acides ribonucléiques, les fortes concentrations d'extrait témoignent d'une nette augmentation.

VI. — Les cellules du sarcome d'Ehrlich traitées par des concentrations suffisantes, bien que vivantes et morphologiquement viables, perdent leur pouvoir infectant pour la Souris dans la proportion de 80 %, conformément aux observations des divers auteurs précédents.

Vu, le Doyen,
H. HERMAN.

Le Président de Thèse,
Professeur J. COUDERT.

Vu et Permis d'Imprimer,
Lyon, le 12 juin 1963.

Le Recteur,
Président du Conseil de l'Université,
P. LOUIS.

BIBLIOGRAPHIE

- BELKIN (M.), TOBIE (E.J.), KAHLER (J.), SHEAR (M.J.). — Absence of effect of lysed *T. cruzi* preparations on Sarcoma 37. *Cancer Research*, 1949, 9, pp. 560.
- BERTALANFFY (Dr F.D.), Winnipeg University of Manitoba. — Le cytodiagnostics du cancer par coloration à l'Acridine-Orange et microscopie par fluorescence. *Revue Triangle* (Laboratoires Sandoz). Vol. V, n° 3, avril 1962.
- BROD (P.). — Résultats provisoires d'un traitement d'une néoplasie à métastases multiples. *Bull. Soc. Med. de Pau*, n° 41, 1960, pp. 28-32.
- CHAGAS (E.). — L'infection expérimentale de l'Homme par le *Trypanosoma cruzi*. *C.R. Soc. Biol.*, (117), 1934, pp. 390-392.
- L'infection expérimentale de l'Homme par le *Schizotrypanum cruzi*. *C.R. Soc. Biol.*, (118), 1935, pp. 290-292.
- CHEVALLIER, BRUMPT, BRIAN (S.) et SABOURAUD. — Essai de traitement des leucopathies par l'inoculation de la maladie de Chagas. *Soc. Fr. Hématologie*, 18, 12, 1947.
- COUDERT (Jean). — Recherches expérimentales et cliniques sur l'action de l'extrait lyophilisé du *Trypanosoma cruzi*. *Antibiotiki* (Moscou), n° 2, 1961, p. 99-105.
- Recherches expérimentales et cliniques sur l'action d'un extrait lyophilisé de *Trypanosoma cruzi* vis-à-vis de quelques néoplasies. *Semaine des Hôpitaux de Paris*: T. 32, 20-12-1956 ; n° 74, pp. 3, 947-954.
- Que peut-on attendre de l'utilisation des extraits de *Trypanosoma cruzi* dans le traitement des néoplasmes ? *Semaine des Hôpitaux*, T. 34, n° 44, 20-12-1958 ; pp. 1290-1294.
- Le traitement biologique du cancer d'après les travaux récents. *Journal de Médecine de Lyon*, 5-3-1958, pp. 217-219.
- Possibilités actuelles offertes par les extraits de *Trypanosomes* de la maladie de Chagas dans le traitement du cancer. *Galenus* (Salonique, Grèce), pp. 365-374. En grec, résumés en anglais et en français.
- Über die Möglichkeit der Krebsbehandlung durch einen Extrakt von *Trypanosoma* dem Erreger der Chagaschen Krankheit. *Medizin Heute B.*, (9), n. 11, nov. 1960, s. 446-453.
- Recherches sur quelques actions d'un extrait de *Trypanosoma cruzi* sur les cellules cancéreuses. *Anais do Congresso Internacional sobre Doença de Chagas*. Rio-de-Janeiro, 5-11 juillet 1959, pp. 447-457.

- COUDERT (J.) et BATTESTI (M^{lle} M.R.). — Recherches sur l'action d'un extrait de *Trypanosoma cruzi* sur le cancer greffable du rat et de la souris. 6^e Congrès de Médecine Tropicale et du Paludisme, Lisbonne, 1958.
- COUDERT (J.), BATTESTI (M^{lle} M.R.) et PAPAGEORGIOU (C.). — Action d'un extrait de *Trypanosoma cruzi* sur l'indice mitotique des cellules néoplasiques en culture de la souche KB. *Revue Lyonnaise de Médecine*. T. 9, n° 10, 30-5-1960, p. 745-750.
- Modifications de l'indice mitotique des cellules en néoplasiques en culture (souche KB) sous l'influence d'un extrait de *Trypanosoma cruzi*. *C.R. Soc. Biologie*, T. 154, n° 3, 1960, pp. 612-615.
- COUDERT (J.) et JUTTIN (P.). — Note sur l'action d'un lysat de *Trypanosoma cruzi* vis-à-vis d'un cancer greffé du rat. *C.R. Soc. Biol.*, (144), juin 1950, pp. 847.
- DAVIDSON (J.N.). — La biochimie des acides nucléiques. Dunod, Paris, 1960.
- DAVID, SPAIN (M.), NORMAN-MOLOMUT et WARSHAW (Léon-J.). — Préparation de lysats de cultures de *T. cruzi* et leur effet sur les souris normales et porteuses de tumeurs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Méd.*, (69), oct. 1948, pp. 134-136.
- ENGEL (R.). — Croissance des tumeurs et maladie de Chagas. *Klin. Wochenschrift*, (23), mars-avril 1944, h. 9-16, pp. 127-129.
- FARAH (Georges). — Essais cliniques de traitement d'états néoplasiques par l'extrait de *Trypanosoma cruzi* (étude clinique d'une centaine d'observations). *Thèse*, Lyon 1959.
- FAYET (Marie-Thérèse). — Dosage des acides Nucléiques dans un épithélium. *Thèse*, Lyon 1954.
- FRAENKEL (T.). — Une orientation nouvelle dans le traitement du cancer. *La Semaine des Hôpitaux*, 14 janv. 1947, n° 7, p. 104.
- GALLARD (H.), BRUMPT (L.), MARTINEZ (R.). — Infections expérimentales à *Trypanosoma cruzi* chez l'Homme, à propos de la biothérapie du cancer. *Bull. Soc. Path. Exot.*, (43), 1950, n° 3-4, pp. 204-216.
- GASIGLIA (René E.L.). — Traitement d'un cancer ulcéré du sein par extrait de *Trypanosoma cruzi*. *Thèse*, Marseille 1960.
- HAUSCHKA (T.), SAXE (L.H. Jr), BLAIR (M.). — *Trypanosoma cruzi* dans le traitement des tumeurs de la Souris. *J. Nat. Cancer Inst.*, 1947, (7), n° 4, pp. 189-197.

- HAUSCHKA (T.S.) et BLAIR-GOODWIN. — Endotoxine (K R) de *Trypanosoma cruzi* dans le traitement des tumeurs malignes de la Souris. *Science*, (107), 2788, 4-6-1948, pp. 601-602.
- HILL (B.R.). — Some properties of lactic deshydrogenase activity in human blood serum elevation, in neoplastic disease. *Proc. of Amer. Assoc. f. Cancer Research.*, 15-17 avril 1955, p. 24.
- Some properties of serum lactic deshydrogenase. *Cancer Research*. (16), juin 1956, n° 5, pp. 460-467.
- HIDEYUKI-TSURKADA. — Correlation between malignancy and metabolism in ascite Ehrlich tumor cells. *Acta japonica pathologica*. (Vol. 10), n° suppl., p. 599-614, 1960.
- KLYUEVA (N.). — Procédés de biothérapie du cancer. *Rev. Acad. Sciences Med. de l'U.R.S.S.*, 1946, n° 2-3.
- Orientation de la biothérapie du cancer. *Le Médecin Français*, 1947, n° 1, pp. 8-9.
- Les voies de la biothérapie du cancer. *Amer. Rew. of Soviet Medicine*, juin 1947, pp. 408-411.
- KLYUEVA (N.) et ROSKIN (G.I.). — Le problème des antibiotiques anticancéreux. *Rev. Ac. des Sciences U.R.S.S.*, (41), 1956, pp. 55-73.
- Le problème des antibiotiques anticancéreux. 1 vol., 247 pages, Moscou 1957.
- KLYUEVA (N.G.) and ROSKIN (G.I.). — Biotherapy of Malignant Tumors. *Pergamon Press*, Oxford, London, New-York, Paris, 1963.
- LOB (G.). — L'action du Schizotrypanum cruzi sur l'adénocarcinome provoqué de la mamelle chez la Souris. *Schweiz. Zeitschr. allgemeine Path. u. Bakt.*, (13), 1950, n° 3, pp. 279-296.
- MARIA (René-Paul-Louis). — Essai d'appréciation sur l'activité clinique des extraits de *Trypanosoma cruzi* sur quelques cancers. *Thèse Médecine*, Paris 1961.
- MALISOFF (W.). — Action de l'endotoxine de *Trypanosoma cruzi* (K R) sur la tumeur maligne de la souris. *Science*, 106, 12-12-1947, 2763, pp. 591-593.
- MARTINEZ MARANON. — Maladie de Chagas et Cancer. *Thèse*, Paris 1949.
- MOUNIER-KUHN (P.), GAILLARD (J.), FONTVIELLE et GAILLARD (L.). — Le *Trypanosoma cruzi* dans le traitement des cancers en oto-rhino-laryngologie. *Journal Français d'O.R.L. et chirurgie maxillo-faciale*. Vol. X, n° 3, avril-mai 1961, p. 367-374.

- MAIRE (R.). — Analyse de quelques observations de cancers de l'estomac traités par injections de *Trypanosoma cruzi*. *La Clinique*, (55), juillet-août 1960, n° 549, pp. 327-329.
- MARVIN (M.), NACHLAS, STANLEY, SELIGNAN. — A colorimetric method for the estimation of succinodeshydrogenase activity. *The Journal of Biological Chemistry*. Feb., 1960, vol. 235, n° 2.
- POLONOVSKI (M.). — *Biochimie Médicale*. Tomes I, II, III, 1962, Masson.
- ROSKIN (G.) et EXEMPLARSKAIA (E.). — Protozooinfection und experimenteller Krebs. *Zeitschrift für Krebsforsch.*, 1931, (34), pp. 628-645.
- ROSKIN (G.) et ROMANOVA (K.). — Action des toxines sur le cancer expérimental. *Acta Cancerologica*, 1935, 1, pp. 323-334.
- Traitement du cancer expérimental par les endotoxines de Protozoaires. *Arch. Int. Med. Exp.*, 1938, 13, pp. 379-384.
- ROSKIN (G.). — Toxin therapy of experimental Cancer. *Cancer Research*, 1946, 6, pp. 363-365.
- ROSKIN (G.I.). — Le problème de la carcinogenèse à la lumière des recherches expérimentales de biothérapie des tumeurs malignes. *Abhandl. der Deutsch. Akad. des Wissensch. z. Berlin*, 1960, n° 3, pp. 334-354.
- ROZEN (Raymond). — Bilan actuel de l'action des extraits de *Trypanosoma cruzi* dans le traitement des Cancers. *Thèse*, Paris 1960.
- RUDALI. — Contribution à l'étude de la Maladie de Chagas. *Thèse*, Paris 1943, n° 17589.
- SVIATOUKHINE (B.M.). — Résultats du traitement du cancer du sein par la médication trypanosomique. *Typographia*, n° 1, Moscou, 1957, 23 pages, 11 photos.
- SPADOTTO. — Contribution à l'étude thérapeutique chez le cancéreux d'un extrait lyophilisé de *Trypanosoma cruzi*. *Thèse*, Paris 1958.
- SPAIN (D.M.), MOLOMUT (N.) et WARSHAW (L.). — Préparation de lysats de cultures de *T. cruzi* et leur effet sur les souris normales et porteuses de tumeurs. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, (69), oct. 1948, pp. 134-136.
- STARKWEATHER (William H. Henry), SCOTCH. — Some observations on the lactate deshydrogenase of human neoplastic tissue. *Bioch. Biophys. Acta.*, 62, 1962, 438-440.

- TORREALBA (J.F.), ROYS (Carlota de), BRA, ITALIA (Ramos). — Otra nota sobre extractos de Protozoarios. *Gaceta Médica de Caracas*, (70), avril-juin 1962, n° 3-6, pp. 291-297.
- TALICE (R.), PICK (F.), PEREZ-MOREIRA (L.). — Tentative de biothérapie par *Trypanosoma cruzi* dans des cas humains de tumeur malignes. *Ann. Fac. Med. Montevideo*, (29), 1954, 2, pp. 207-224.
- VON BRAND (Th.). — Old and new observations on the chemical composition of *Trypanosoma cruzi*. *Rev. Inst. Med. Trop.*, Sao-Paulo, 4, mars-avril 1962, n° 2, pp. 47-148.
- WROBLEWSKI (Félix) and WROBLEWSKI (Rita). — The clinical significance of lacticodeshydrogenase activity of serous effusions. *Annals of Internal. Medicine*, vol. 48, n° 1, april 1958.
- WARBURG (Otto). — Métabolisme cellulaire et métabolisme des Tumeurs. Tomes I et II (traduit par E. AUBEL et L. GENEVOIS). Librair. Félix Alcan, 1928.
- YAFFE (David). — The distribution and in vitro propagation of an agent causing high plasma Lactic deshydrogenase Activity. *Cancer Research*. (University of Chicago), vol. 22, june 1962, n° 5, pp. 573-580.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	17
HISTORIQUE	19
LES ENZYMES GLYCOLYTIQUES	25
LES ACIDES NUCLÉIQUES	93
CONCLUSION GÉNÉRALE	121
BIBLIOGRAPHIE	125

